

**Pigment-Protein-Komponenten des Photosyntheseapparates
aus dem Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* und
tagesrhythmische Änderungen ihrer Organisation**

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen
als Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von
Jürgen Knötzel

Bremen 1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543119_0156

**Pigment-Protein-Komponenten des Photosyntheseapparates
aus dem Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* und
tagesrhythmische Änderungen ihrer Organisation**

vorgelegt dem Fachbereich 2 (Biologie/Chemie)
der Universität Bremen
als Dissertation zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

von Jürgen Knötzel

Bremen 1988

Tag des öffentlichen Kolloquiums:

09.09.88

Gutachter der Dissertation:

Prof. Dr. L. Rensing

Prof. Dr. L.H. Grimme

Inhalt

1	Einleitung und Fragestellung	0
2	Material und Methoden	15
2.1	Organismen und Kulturbedingungen	15
2.2	Präparation von Thylakoidmembranen aus <i>Gonyaulax</i>	15
2.3	Präparation des wasserlöslichen Peridinin-Chl α -Proteins	16
2.4	Präparation von Thylakoidmembranen, PS I- und PS II-Komplexen aus Spinat	16
2.5	Deriphat-PAGE von SDS-solubilisierten Thylakoidmembranen aus <i>Gonyaulax</i> und Spinat	17
2.6	Absorptions- und Fluoreszenzspektren	19
2.7	Analyse der Polypeptidzusammensetzung	19
2.8	Pigmentanalytik	20
2.8.1	Pigmentextraktion	20
2.8.2	Chromatographie	20
2.8.3	Identifizierung der Pigmente	21
2.8.4	Quantitative Bestimmung der Pigmente	21
2.9	Bestimmung der Photosynthesekapazität und der Dunkelatmung	23
2.10	Bestimmung des photosynthetischen Elektronentransportes	23
2.10.1	Gesamtelektronentransport	23
2.10.2	PS II-Aktivität	24
2.10.3	PS I-Aktivität	24
2.11	Fluoreszenzinduktionsmessungen	24
2.11.1	Durchführung	24
2.11.2	Quantitative Auswertung	25
3	Ergebnisse	28
3.1	Trennung und Identifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus <i>Gonyaulax</i>	28
3.2	Auftrennung und Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe aus <i>Gonyaulax</i>	33
3.2.1	Die membran-intrinsischen Pigment-Protein-Komplexe	33
3.2.2	Das wasserlösliche Peridinin-Chlorophyll α -Protein	43
3.3	Auftrennung und Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe aus Spinat	43
3.4	Versuche zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates von <i>Gonyaulax</i>	51
3.4.1	Die Photosynthesekapazität, die Abhängigkeit der Photosynthesekapazität von der Lichtintensität, und der Pigmentgehalt ganzer Zellen	51

3.4.2	Der photosynthetische Elektronentransport	58
3.4.3	Die membran-intrinsischen und wasserlöslichen Pigment-Protein-Komplexe	60
3.4.4	Fluoreszenzinduktionsmessungen zur Analyse der PS II-Struktur	64
4	Diskussion	71
4.1	Molekulare Architektur der Pigment-Protein-Komplexe in den Thylakoidmembranen von <i>Gonyaulax</i> und Spinat	71
4.1.1	Die PS I-Komplexe	71
4.1.2	Die PS II-Komplexe und assoziierte Antennenkomplexe	76
4.2	Circadiane Photosyntheserhythmik und die strukturelle und funktionelle Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran von <i>Gonyaulax</i>	83
5	Zusammenfassung/Summary	93
6	Literatur	98

Abkürzungen

$\alpha_{\max}$	maximaler Anteil der α -Zentren am Photosystem II
AP	Ammonium-Persulfat
ASC	Natriumascorbat
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta_{\max}$	maximaler Anteil der β -Zentren am Photosystem II
Car	Carotinoid(e)
CHAPS	3[3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
Chl	Chlorophyll(e)
CT	Circadian time
Cyt f	Cytochrom b_6/f -Komplex
DAD	2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-phenylendiamin (Diaminoduren)
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff (Diuron)
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
D(H)Q	2,3,5,6-Tetramethyl-1,4-benzochinon (Duro(hydro)chinon)
EDTA	Ethylen-diamin-tetra-essigsäure
F _D	Ferredoxin
FeCN	Kaliumhexacyanoferrat(III)
k_{α}	Geschwindigkeitskonstante für den Photoneneinfang des PS II _{α}
k_{β}	Geschwindigkeitskonstante für den Photoneneinfang des PS II _{β}
kDa	Kilo-Dalton
LDW	Licht-Dunkel-Wechsel
LHC	Light-Harvesting Complex
MV	1,1-Dimethyl-4,4-dipyridyl-dichlorid (Methylviologen)
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
P680	Reaktionszentrum des PS II
P700	Reaktionszentrum des PS I
P _{max}	maximale Photosyntheserate
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PC	Plastocyanin
PCP	Peridinin-Chl a-Protein
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPC	Pigment-Protein-Komplex
PS I	Photosystem I
PS II	Photosystem II
PSU	Photosynthetische Einheit
Q	primärer Akzeptor des PS II
RC, RZ	Reaktionszentrum
rpHPLC	reversed-phase Hochdruckflüssigkeitschromatographie
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan
X	primärer Akzeptor des PS I
Xan	Xanthophyll(e)

1. Einleitung und Fragestellung

Eukaryotische Organismen besitzen die Fähigkeit, ihre Funktionen in Beziehung zur Tageszeit oder anderen zyklischen Veränderungen der Umgebung zu regulieren. Beträgt die Periodenlänge dieser Zyklen unter konstanten Bedingungen etwa 24 h, spricht man von 'circadianen' Rhythmen. Sie sind in einer Reihe von Eukaryoten nachgewiesen und betreffen eine Vielfalt von physiologischen und biochemischen Lebensprozessen, sowie Änderungen des Verhaltens. So verändern sich u. a. Bewegungsaktivität, Phototaxis, Zellteilung, Proteinsynthese, DNA- und RNA-Konzentrationen und Enzymaktivitäten bei einzelligen Organismen periodisch (vergl. EDMUNDS 1984).

Anfang der fünfziger Jahre wurde es möglich, den Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* im Labor zu kultivieren. Dieser Dinoflagellat zeigte auch unter Laborbedingungen Biolumineszenz, und es konnte ein circadianer Rhythmus stimulierter Lumineszenz nachgewiesen (SWEENEY & HASTINGS 1957) und Aspekte der Biochemie der Lumineszenz charakterisiert werden (HASTINGS & SWEENEY 1957, vergl. SWEENEY 1987).

Dinoflagellaten wurden zu bevorzugten Organismen bei der Untersuchung circadianer Rhythmen. Mittlerweile sind für *Gonyaulax* rhythmische Aktivitäten u. a. hinsichtlich der Zellteilung (SWEENEY & HASTINGS 1958), der Proteinsynthese (VOLKNANDT & HARDELAND 1984, CORNELIUS et al. 1985, SCHROEDER-LORENZ & RENSING 1986), der DNA-Synthese (VICKER et al. 1988), der Mitochondrientellung und Chromosomenentspiralisierung (DONNER & RENSING 1984) beschrieben worden.

Ein großer Teil der Untersuchungen zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates wurde an *Gonyaulax* durchgeführt (SWEENEY 1984). Dieser Dinoflagellat zeigt unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen eine ausgeprägte Rhythmik der Photosynthesekapazität, gemessen entweder als Sauerstoffproduktion (PREZELIN & SWEENEY 1977) oder als CO₂-Inkorporation (HASTINGS et al. 1961). Die maximale Photosynthesekapazität fand man unter konstantem Licht in der Mitte der Phase, die vorher 'Tag' war (subjektiver Tag), die minimale Photosynthesekapazität in der Mitte der früheren Nacht korrespondierenden Phase (subjektive Nacht).

Die molekularen Mechanismen der circadianen Veränderungen der Photosynthesekapazität sind nicht bekannt. Die Photosynthese-

rhythmik konnte nicht auf Veränderungen des Pigmentgehaltes zurückgeführt werden, da dünnschichtchromatographische Analysen ergaben, daß der Chlorophyll- und Carotinoidgehalt sich tagesrhythmisch nicht ändern (PREZELIN et al. 1977, PREZELIN & MATLICK 1980).

Untersuchungen zum photosynthetischen Elektronentransport über beide Photosysteme (PS) ergaben rhythmische Veränderungen des Elektronenflusses in isolierten Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* (SAMUELSSON et al. 1983), in ganzen Zellen der Grünalge *Euglena* sp., und in isolierten Chloroplasten aus *Euglena* sp. bzw. aus höheren Pflanzen (LONERGAN & SARGENT 1979, LONERGAN 1981). Der Versuch, einen Einfluß der endogenen Rhythmik auf Teilreaktionen des photosynthetischen Elektronentransportes nachzuweisen, ergab widersprüchliche Resultate. Von einer rhythmischen Photosystem II-Aktivität wird bei *Gonyaulax* berichtet (SAMUELSSON et al. 1983), während in *Euglena* sp. und höheren Pflanzen keine Rhythmik nachgewiesen werden konnte (LONERGAN & SARGENT 1979, LONERGAN 1981). Für Photosystem I-Aktivitäten konnte keine rhythmischen Oszillationen nachgewiesen werden (LONERGAN & SARGENT 1979, LONERGAN 1981, SAMUELSSON et al. 1983). Insgesamt deuten diese Ergebnisse nach Ansicht der Autoren auf eine Kontrolle der Koordination der beiden Photosysteme durch die circadiane Uhr über die nicht-zyklische Elektronentransportkette (LONERGAN & SARGENT 1979, LONERGAN 1984).

Neben den Messungen der Photosynthesekapazität und des Elektronentransportes wurden fluorimetrische Untersuchungen zur Klärung der Mechanismen der Photosyntheserhythmik eingesetzt. Messungen der Fluoreszenzintensität in verschiedenen Phasen der Induktionskinetik zeigten in *Gonyaulax*-Zellen einen Rhythmus der Chlorophyll a-Fluoreszenz bei Raumtemperatur (PREZELIN & SWEENEY 1977, SWEENEY et al. 1979). Da nur Lichtenergie, die nicht in der Photosynthese verwertet werden kann, als Fluoreszenz abgestrahlt wird, vermuteten die Autoren eine Inaktivierung von photosynthetischen Einheiten der Thylakoidmembranen während der subjektiven Nachtphase. Die Aufnahme von Tieftemperatur-Fluoreszenzemissionsspektren, die eine Zuordnung der Maxima des abgestrahlten Fluoreszenzlichtes zum Photosystem II (685 nm) bzw. Photosystem I (720 nm) erlaubt, ergab eine Rhythmik des F_{720}/F_{685} -Verhältnisses. In der subjektiven Tagphase, wenn die photosynthe-

tische Sauerstoffentwicklung am größten ist, ergibt sich das höchste F_{720}/F_{685} -Verhältnis in den Grünalgen *Euglena* sp. (LONERGAN & SARGENT 1979) und *Acetabularia* sp. (vergl. SWEENEY & PREZELIN 1978). Das wurde als ein Anstieg der Effektivität des Energietransfers vom Photosystem II zum Photosystem I während des subjektiven Tages gedeutet. Wie diese verschiedenen Fluoreszenzrhythmen mit den anderen Photosyntheserhythmen zusammenhängen, ist bislang unklar (LONERGAN 1984).

Ultrastrukturelle Untersuchungen der Thylakoidmembran von *Gonyaulax* zeigten, daß die Größe von Gefrierbruchpartikeln im Verlauf von Rhythmusversuchen unverändert blieb (SWEENEY 1981). Während für diese vermutlichen PS II-Partikel keine circadianen Veränderungen nachgewiesen werden konnten, wurden Unterschiede in der Chloroplastenform und der Verteilung der Chloroplasten in der Zelle festgestellt (HERMAN & SWEENEY 1975, RENSING et al. 1980). Diese Veränderung der Chloroplastenform war begleitet von einer Umorganisation der Thylakoidmembran: so scheint die Stapelung der Thylakoidmembran einen rhythmischen Wechsel durchzumachen (RENSING et al. 1980).

Obwohl eine relativ große Anzahl von Untersuchungen zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax* vorliegen, gibt es wenig Informationen über dessen Aufbau und Organisation. Untersuchungen zur Architektur des Photosyntheseapparates sind jedoch eine wichtige Voraussetzung für ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der rhythmischen Veränderungen der Photosyntheseeffektivität.

Die bisher vorliegenden Untersuchungen zur Organisation der Chlorophylle (Chl) und Carotinoide (Car) im Photosyntheseapparat von Dinoflagellaten haben zur partiellen Charakterisierung von drei Pigment-Protein-Komplexen (PPC) geführt.

Als erster Komplex ist ein P700-Chl a-Komplex zu nennen, der aus *Glenopodium* sp. und *Gonyaulax* nach Triton X-100-Solubilisierung und Hydroxylapatit-Chromatographie oder nach SDS-Solubilisierung und SDS-PAGE isoliert werden konnte (PREZELIN & ALBERTE 1978). Der Komplex soll hinsichtlich seiner spektralen Eigenschaften, seiner elektrophoretischen Mobilität in der SDS-PAGE und einem Chl a/P700-Verhältnis von etwa 50 identisch sein mit dem P700-Chl a-Protein aus höheren Pflanzen und Grünalgen (PREZELIN 1987).

Der zweite Komplex, der aus Dinoflagellaten isoliert wurde, ist ein Chl a/c -Antennenkomplex, der einen großen Teil des gesamten Chl c_2 bindet (BOCZAR et al. 1980, BOCZAR & PREZELIN 1986). Für *Glenopodium* sp. und *Gonyaulax* wurden in diesem Komplex Chl c/a -Verhältnisse von 3.0-4.8 ermittelt (BOCZAR & PREZELIN 1986, 1987). Eine Zusammenstellung der Antennenkomplexe für die am besten untersuchten Dinoflagellaten *Glenopodium* sp. und *Gonyaulax polyedra* zeigt die Tabelle 1.

Tabelle 1: Antennenkomplexe in Dinoflagellaten

Spezies	Membran-intrinsische Pigment-Protein-Komplexe	Wasserlösliche Pigment-Protein-Komplexe
<i>Glenopodium</i> sp.	Chl a -Peridinin-Protein (2) Peridinin/Chl a = 3.2-3.4/1 35%-48% Chl a 49, 30-35, 19 kDa	Peridinin-Chl a -Protein (3) Peridinin/Chl a = 4/1 25% Chl a 15.5 kDa
	Chl a/c_2 -Xanthophyll-Protein (1,2) Chl c_2/a = 4.2-4.8/1 20%-30% Chl a 37, 24, 22, 19 kDa	
<i>Gonyaulax polyedra</i>	Chl a/c_2 -Peridinin-Protein (4) Chl a/c_2 = 4/1 46%-49% Chl a 45, 24-37, 19, 17 kDa	Peridinin-Chl a -Protein (3) Peridinin/Chl a = 4/1 20%-30% Chl a 32 kDa
	Chl a/c_2 -Protein (4) Chl c_2/a = 3.0-3.8/1 7%-14% Chl a 49, 38, 32, 25, 16 kDa	

Referenzen: 1 BOCZAR et al. (1980); 2 BOCZAR & PREZELIN (1986);
3 PREZELIN & HAXO (1976); 4 BOCZAR & PREZELIN (1987).

Der dritte Komplex ist das wasserlösliche Peridinin-Chlorophyll a -Protein (PCP), das sehr leicht aus aufgebrochenen Zellen extrahiert werden kann (PREZELIN & HAXO 1976, HAXO et al. 1976, SIEGELMAN et al. 1977). So ist das Peridinin-Chl a -Protein hinsichtlich der molekularen Topologie für die Dinoflagellaten *Glenopodium* sp. und *Gonyaulax* recht gut charakterisiert (SONG et al. 1976, KOKA & SONG 1977, SONG 1978). PCP-Komplexe dieser beiden Dinoflagellaten binden ausschließlich Peridinin und Chl a , und zwar im Verhältnis 4/1 (mol/mol) (Tab. 1). Als PCP-Apopro-



teine wurden in *Gonyaulax* einzelne Polypeptide von 30-35 kDa, in *Glenopodium* sp. zwei Polypeptide von 15-17 kDa, ermittelt (PREZELIN & HAXO, 1976).

Dennoch bleiben zwei Punkte hinsichtlich des Peridinin-Chl *a*-Proteins und des Peridinins unklar: einerseits die Platzierung des PCP an bzw. in der Thylakoidmembran sowie das Vorhandensein des Peridinins in anderen Pigment-Protein-Komplexen aus Dinoflagellaten. Während PREZELIN & SWEENEY (1978) zu dem Schluß kamen, daß das gesamte Peridinin in *Gonyaulax* an PCP gebunden ist, konnte in anderen Dinoflagellaten nur ein sehr geringer Teil des Peridinins als wasserlösliches PCP extrahiert werden (PREZELIN & HAXO, 1976). Das kann einerseits bedeuten, daß eine Veränderung der Aminosäurezusammensetzung oder des Arrangements der wasserlöslichen PCP zu einer verringerten Extrahierbarkeit führt, andererseits kann Peridinin aber auch in anderen Komplexen als dem wasserlöslichen PCP gebunden sein. Unterstützt wird die letztere Vermutung durch das Auftreten von membran-intrinsischen Peridinin- und Chl *a*-enthaltenden Komplexen, die als Banden nach Deriphat-PAGE solubilisierter Thylakoidmembranen von Dinoflagellaten aufgetreten sind (BOCZAR et al. 1980, BOCZAR & PREZELIN 1986, 1987).

Basierend auf diesen Kenntnissen über die Pigment-Protein-Komplexe aus Dinoflagellaten, der Chl *a*-Verteilung auf die PPC, der photoadaptiven Physiologie und der Fluoreszenzcharakteristika ganzer Zellen wurde ein Modell zur Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in einer funktionellen photosynthetischen Einheit (PSU) entwickelt (PREZELIN & ALBERTE 1978, GOVINDJEE et al. 1979, PREZELIN 1987). Dieses Modell ist in Abbildung 1 dargestellt. Es beinhaltet Chl *a*-Core Komplexe des PS I und PS II, die über einen Chl *a*-Antennenkomplex (Light-Harvesting Chl *a*-Protein) verbunden sind. Dieser Komplex soll das Einfangen und die Verteilung der Lichtenergie von den weiteren Antennenkomplexen zu den Photosystemen und zwischen den Photosystemen ermöglichen. Das Chl *a/c*-Protein (Light-Harvesting Chl *a/c*-Protein) ist einerseits in der Nähe der hydrophoben Chl *a*-Core Komplexe plaziert, andererseits steht es in Verbindung mit dem wasserlöslichen Peridinin-Chl *a*-Protein.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß die Ergebnisse der Messungen zur Rhythmik der Photosynthesekapazität, des photosynthetischen Elektronentransportes und der Chl *a*-Fluoreszenz

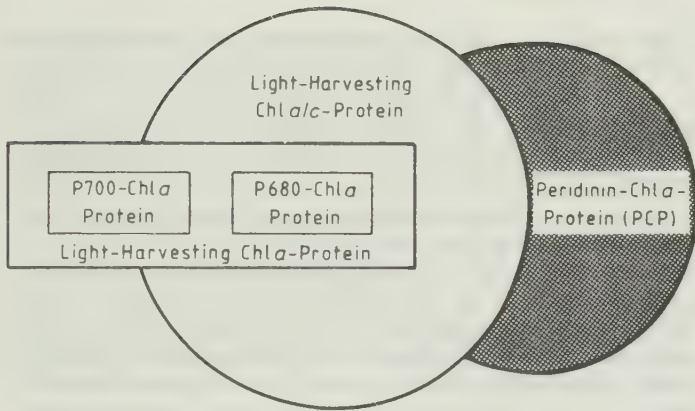


Abb. 1: Modell zur Organisation von Pigment-Protein-Komplexen im Photosyntheseapparat von *Gonyaulax polyedra* (nach PREZELIN & ALBERTE 1978, PREZELIN 1987). Erläuterungen siehe Text.

zeigen, daß der Photosyntheseapparat eine rhythmisch wechselnde Effektivität der Lichtverarbeitung besitzt. Aufgrund der Ergebnisse der Fluoreszenzanalysen kann man vermuten, daß die Photosyntheserhythmik das Resultat einer Veränderung der Organisation der Thylakoidmembranen ist. Es wurde ferner dargestellt, daß wenig Daten zur molekularen Architektur des Photosyntheseapparates in *Gonyaulax* vorliegen.

Ziel dieser Arbeit ist es, zur Klärung der molekularen Vorgänge bei der circadianen Photosyntheserhythmik beizutragen. Da die Struktur und Organisation der makromolekularen Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran eine entscheidende Rolle bei der Festlegung ihrer photosynthetischen Effektivität spielt (vergl. BAKER & WEBBER 1987), soll in der vorliegenden Arbeit zunächst versucht werden, die Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* zu isolieren und zu charakterisieren.

Dazu wird eine Methode zur Fraktionierung der membranintrinsic Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* entwickelt, bei der möglichst wenig freies Pigment entsteht. Hierzu wurde die von MARKWELL et al. (1978, 1979) für die Auftrennung von PPC aus höheren Pflanzen entwickelte Deriphat-PAGE ausgewählt und für die Anwendung bei der Auftrennung von PPC aus *Gonyaulax* optimiert. Diese Methode liefert weniger PPC als die anderen

häufig eingesetzten Elektrophoresesysteme von ANDERSON et al. (1978) und MACHOLD et al. (1979). Die PPC nach Deriphat-PAGE sind größer und komplexer, und dadurch ergeben sich Vorteile gegenüber anderen elektrophoretischen Systemen bei der Analyse der molekularen Architektur und Organisation der Pigment-Protein-Komplexe (MARKWELL 1986).

Bisher liegen keine umfassenden Angaben zur Pigmentzusammensetzung der membran-intrinsischen Pigment-Protein-Komplexe vor. Es wurden nur spektralphotometrische Bestimmungen des Chl *a*- und Chl *c*₂-Gehaltes für einzelne Komplexe durchgeführt, während dünnsschichtchromatographische Methoden benutzt wurden, um auf das Vorhandensein von Peridinin, gelben Xanthophyllen und β -Carotin in PPC zu schließen (BOCZAR et al. 1980, BOCZAR & PREZELIN 1987).

Deshalb mußte ein System zur Auftrennung und Quantifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus *Gonyaulax* entwickelt werden, in dem die Pigmente mittels 'reversed-phase' Hochdruckflüssigkeitschromatographie (rpHPLC) getrennt werden.

Die isolierten membran-intrinsischen PPC aus *Gonyaulax* werden hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften, ihres Pigmentmusters und ihrer Polypeptidzusammensetzung charakterisiert. Basierend auf den Ergebnissen dieses Fraktionierungssystems wird ein Modell zur Organisation der Chlorophylle und Carotinoide in der Thylakoidmembran von *Gonyaulax* vorgeschlagen.

Die Reaktionszentrum (RZ)-Komplexe gelten in höheren Pflanzen und verschiedenen Algenstämmen bezüglich ihres Pigmentmusters und ihrer photochemischen Eigenschaften als sehr einheitlich. Um aus einem unmittelbaren Vergleich der PPC verschiedener Organismen eine weitere Zuordnung der PPC zu Reaktionszentrum- und Antennenkomplexen zu ermöglichen, werden solubilisierete Spinat-Thylakoidmembranen im Deriphat-System elektrophoretisiert, und in gleicher Weise charakterisiert. Zur weiteren Identifizierung der Banden im Gel werden PS I-Komplexe (MULLET et al. 1980) und PS II-Partikel aus Spinat-Thylakoidmembranen (BERTHOLD et al. 1981) aufgetrennt.

Die aus der Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe gewonnenen Kenntnisse über die molekulare Architektur des Photosyntheseapparates sowie mögliche Veränderungen während der circadianen Rhythmik sind Voraussetzung bei der Analyse der rhythmischen Veränderungen der Photosyntheseeffektivität. Diese Analyse

der rhythmischen Veränderungen muß notwendigerweise zusätzlich zur Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe eine Untersuchung unter funktionalen Gesichtspunkten einschließen.

Die Versuche zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates erfolgen an Zellen, die nach der Kultivierung in einem Licht-Dunkel-Wechsel (LDW) von 12/12 h unter konstanten Licht- und Temperaturbedingungen gehalten werden (Rhythmusversuche). Daneben werden dieselben Experimente mit Zellen durchgeführt, die dauernd im LDW verbleiben (LDW-Versuche). Zunächst soll die Bestimmung der Photosynthesekapazität als Sauerstoffproduktion ganzer Zellen einen Hinweis auf die Zeitpunkte maximaler bzw. minimaler Photosynthesekapazität geben. Photosynthetisch aktive Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* sollen zu einer Klärung der Frage beitragen, ob photosynthetische Teilreaktionen, etwa die PS I- oder PS II-Aktivität, für die Photosyntheserhythmik verantwortlich sein können. Da es, wie bereits festgestellt wurde, Hinweise auf eine Kontrolle der Koordination der beiden Photosysteme gibt, wird der Plastochinon-Pool in die Elektronentransportmessungen mit einbezogen. Die Reoxidation des reduzierten Plastochinon durch den Cytochrom b_6/f -Komplex ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der photosynthetischen Elektronentransportkette (WITT 1971).

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung werden erstmals an Dinoflagellaten Fluoreszenzinduktionsmessungen an ganzen, mit DCMU behandelten Zellen durchgeführt, um Hinweise auf eine PS II-Heterogenität zu erhalten. Solche Untersuchungen haben in den letzten Jahren vor allem bei höheren Pflanzen und Grünalgen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Organisation des PS II in den Thylakoidmembranen dieser Organismen geliefert (ANDERSON & MELIS 1983). Es konnten zwei verschiedene Typen von PS II-Komplexen unterschieden werden, PS II $_{\alpha}$ und PS II $_{\beta}$. Diese beiden Formen unterscheiden sich hinsichtlich einer Anzahl von funktionellen und strukturellen Aspekten (vergl. HODGES & BARBER 1986, BAKER & WEBBER 1987). So wird untersucht, ob es analoge PS II-Formen auch in *Gonyaulax* gibt, und ob Veränderungen der relativen Anteile der beiden Typen im Verlauf von Rhythmusversuchen mit der circadianen Rhythmik der Photosynthesekapazität in Zusammenhang stehen.

Mit der Kenntnis der Elektronentransportraten, der Pigmentzusammensetzung der Pigment-Protein-Komplexe und der Ergebnisse der Fluoreszenzanalysen sind Rückschlüsse darüber möglich, welche molekularen Vorgänge bei der Photosyntheserhythmik auf der Ebene der Thylakoidmembran eine Rolle spielen.

2. Material und Methoden

2.1 Organismen und Kulturbedingungen

Die Kultivierung von *Gonyaulax polyedra* STEIN (strain 70) erfolgte in mit f/2-Medium angereichertem, autoklavierten Seewasser nach GUILLARD & RYTHER (1962) (ohne zusätzliches Silikat) bei einer Lichtintensität von $66 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (5500 lux) (TLD 36W/25 'Universal-Weiss', Osram, Berlin, FRG), bei einem Licht-Dunkel-Wechsel (LDW) von 12:12 Stunden und bei einer Temperatur von 19-21°C.

Die LDW-Versuche erfolgten unter diesen Bedingungen. Für die Versuche zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates wurden Zellkulturen der frühen exponentiellen Wachstumsphase (4000-5000 Zellen ml^{-1}) mit Beginn der Lichtperiode aus dem Licht-Dunkel-Wechsel in konstantes Dämmerlicht von $22 \mu\text{E s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (1800 lux) überführt. Diese Lichtintensität erlaubt eine ausreichende Bruttphotosynthese. Vor Beginn der eigentlichen Messungen zur endogenen Rhythmik waren die Zellen für 24 h im Dauerdämmerlicht.

Die Zellzahl der Algen wurde mit einem Coulter Counter ZB mit Channelizer C-1000 (beide Coulter Electronics, Luton, U.K.) bestimmt. Dazu wurden 10 ml der Algenkultur mit 10 ml f/2-Medium verdünnt und 2 ml dieser Algensuspension (Count Volume) mit einer 200 μm -Kapillare bei folgenden Geräteeinstellungen gemessen: 1/Amplifikation: 16, 1/Aperture Current: 1, Lower Threshold: 5, Upper Threshold: off (Counter); Base Channel Threshold: 5, Window Width: 100 (Channelizer).

2.2 Präparation von Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax*

Die *Gonyaulax*-Zellen wurden auf einem Filter Whatman GF/C (Herolab, St. Leon-Rot, FRG) geerntet und in 10 mmol l^{-1} Tricin-NaOH (pH 7.2), 10 mmol l^{-1} NaCl, 10 mmol l^{-1} KCl, 5 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.2 mol l^{-1} Sorbitol, 1 mmol l^{-1} PMSF überführt.

Zum Zellaufbruch wurde die Suspension in 40 ml-Röhrchen mit konischem Boden verteilt und Glasperlen (0.5 mm Durchmesser) in einem Verhältnis Algensuspension zu Glasperlen von 1/3 (w/w) zugegeben, so daß das Gesamtvolumen pro Röhrchen nicht mehr als 10 ml betrug. Die Röhrchen wurden auf Eis gekühlt, der Aufbruch der Algen erfolgte durch Schütteln der Röhrchen auf einem Heidolph-Schüttler (Heidolph, Kelheim, FRG) bei höchster Geschwindigkeit für 3 x 20 s (dazwischen jeweils 15 s Unterbrechung). Die Suspension wurde durch Filtration über eine G-1 Fritte (Schott, Mainz, BRD) von den Glasperlen getrennt.

Der Zellaufbruch wurde bei 100 g für 5 min (Rotor SS 34, Sorvall-Zentrifuge RC-5, Du Pont Instruments, Bad Nauheim, BRD) zentrifugiert, um die nicht aufgebrochenen Zellen und große Zellbruchstücke zu entfernen. Der Überstand wurde bei 12500 g/5 min zentrifugiert.

Der nach dieser Zentrifugation entstandene Überstand diente als Ausgangsmaterial für die weitere Präparation der wasserlöslichen Peridinin-Chlorophyll a-Proteine (siehe Abschnitt 2.3).

Die pelletierten Thylakoidmembranen wurden mehrmals gewaschen. Zunächst wurden die Membranen in 10 mmol l⁻¹ Tricin-NaOH (pH 7.2), 10 mmol l⁻¹ NaCl, 10 mmol l⁻¹ KCl, 5 mmol l⁻¹ MgCl₂, 1 mmol l⁻¹ PMSF resuspendiert, der zweite Waschschritt wurde mit 50 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol l⁻¹ EDTA, 1 mmol l⁻¹ PMSF durchgeführt. Die Membranen wurden jeweils bei 15000 g/10 min pelletiert.

Die gewaschenen Membranen wurden mit 10% Glycerol (v/v) auf 500 µg Chl a ml⁻¹ eingestellt. Die Thylakoidmembranen wurden in der Regel sofort verarbeitet, oder aber in flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

2.3 Präparation des wasserlöslichen Peridinin-Chlorophyll a-Proteins

Der während der Präparation der Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* anfallende Überstand mit ungereinigten PCP's (Abschnitt 2.2) wurde bei 144000 g für 4 h in einer Ultrazentrifuge (Kontron, Zürich, Schweiz) im Rotor TFT 70.38 zentrifugiert, um Membranbruchstücke zu sedimentieren. Nach der Zentrifugation wurden die im Überstand befindlichen PCP-Komplexe gegen 5 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.4) dialysiert und anschließend mit Hilfe von Polyäthylenglykol 20000 konzentriert.

Die weitere Aufreinigung erfolgte durch Chromatographie auf einer mit Sephadex G-100 gepackten Säule (20 cm Länge x 0.8 cm innerer Durchmesser), die mit 5 mmol l⁻¹ Tris-HCl (pH 8.4) equilibriert war. Die Elution der PCP erfolgte mit diesem Puffer, der zusätzlich 0.2 mol l⁻¹ NaCl enthielt.

2.4 Präparation von Thylakoidmembranen, PS I- und PS II-Komplexen aus Spinat

50g-100g Spinatblätter ohne Mittelrippe wurden in ca. 250 ml 50 mmol l⁻¹ Tricin-NaOH (pH 7.8), 10 mmol l⁻¹ NaCl, 0.4 mol l⁻¹

Sucrose überführt, im Waring Blendor CB-6 (Waring, New Hartford, CT, USA) dreimal für 5 s bei mittlerer Geschwindigkeit homogenisiert und durch 2 Lagen pufferbefeuchtetes Miracloth (Calbiochem-Behring, La Jolla, CA, USA) filtriert. Zur Entfernung ganzer Zellen und Zelltrümmer wurde das Filtrat bei 270 g/5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde bei 12000 g/10 min zentrifugiert, die pelletierten Thylakoidmembranen wurden mit 50 mmol l⁻¹ Tricin-NaOH (pH 7.8), 10 mmol l⁻¹ NaCl gewaschen, und bei 12000 g/5 min erneut zentrifugiert.

Das Pellet wurde in 10% Glycerol (w/v) resuspendiert und der Chlorophyllgehalt auf 1000 µg ml⁻¹ eingestellt. Thylakoidmembranen wurden entweder sofort elektrophoretisiert oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die Präparation der PS I-200 Komplexe erfolgte nach DAMM (1987) und wurde freundlicherweise von Dr. I. Damm (Universität Bremen) durchgeführt.

PS II-Membranen (BBY-Partikel) wurden weitgehend gemäß der Originalvorschrift (BERTHOLD et al. 1981) präpariert, mit der Ausnahme, daß die zweite Detergenzbehandlung weggelassen wurde (DUNAHAY et al. 1984).

2.5 Deriphat-PAGE von SDS-solubilisierten Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* und Spinat

Die DERIPHAT-PAGE wurde mit Rundgelelektrophoresekammern (Shandon Labortechnik, Frankfurt, BRD, und Eigenbau) für jeweils 12 Röhrchen (9 cm Länge x 0.6 cm innerer Durchmesser) unter Verwendung eines Vokam Netzgerätes SAE 2761, oder mit dem Plattengelelektrophoresegerät ProteanTM Double Slab Electrophoresis Cell (Bio-Rad, München, BRD) mit einem Netzgerät der Firma Hölzel (Hölzel Technik, Dorfen, BRD) durchgeführt.

Stammlösungen: (a) Trenngelmonomer: 40 g Acrylamid (Serva, 2 x kristallisiert, reinst) - 2 g N,N'-Methylenbisacrylamid; (b) 0.5% (w/v) Ammonium-Persulfat (AP) (Serva); (c) 0.4% (v/v) N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) (Serva); (d) Pufferstammlösung: 99.2 mmol l⁻¹ Tris-768 mmol l⁻¹ Glycin.

Die Filtration und Aufbewahrung der Stammlösungen erfolgte wie bei PICCIONI et al. (1982) beschrieben. Die Lösungen (b) und (c)

Tabelle 2: Solubilisierungsmedien und Gelrezepte (modifiziertes MARS-System)

	Gonyaulax	Spinat	
Solubilisierungs- medium	24.8 mmol l ⁻¹ Tris 192 mmol l ⁻¹ Glycin 30% Glycerol (v/v) 1.5% SDS (w/v)	24.8 mmol l ⁻¹ Tris 192 mmol l ⁻¹ Glycin 30% Glycerol (v/v) 1% SDS (w/v)	
	Solubilisierung durch Mischen gleicher Volumina Solubilisierungsmedium und Membransuspension		
Chlorophyllgehalt der Thylakoidmembranen	500 µg Chl <u>a</u> ml ⁻¹	1000 µg Chl ml ⁻¹	
Detergenz/Chl (<u>a</u>)- Verhältnis	30 : 1	10 : 1	
Gelrezepte (jeweils ausreichend für 5 Rundgelröhrchen)			
	Volumen	Endkonzentration	Volumen
Trenngel-Monomer	1.5 ml	5% Acrylamid- 0.25% Methylenbis- acrylamid	1.5 ml
PufferstammLösung	1.5 ml	12.4 mmol l ⁻¹ Tris 96 mmol l ⁻¹ Glycin	-
	-	24.8 mmol l ⁻¹ Tris 196 mmol l ⁻¹ Glycin	3.0 ml
AP-Lösung (0.5%, w/v)	3.0 ml	0.125%	3.0 ml
TEMED-Lsg. (0.4%, v/v)	3.0 ml	0.1%	3.0 ml
Deriphat-Lsg. (30%, w/v)	40 µl	0.1%	40 µl
Bidest. H ₂ O	2.96 ml		1.46 ml
Gesamtvolumen	12 ml		12 ml

wurden unmittelbar vor Gebrauch frisch angesetzt. Die 30%ige Deriphat-Lösung (w/v) (N-Lauryl-beta-iminopropionsäure, Na-Salz) wurde von Serva (Heidelberg, FRG), SDS von BDH (Poole, U.K.) bezogen.

In Tabelle 2 sind die Solubilisierungsmedien und Gelrezepte des für die Auftrennungen modifizierten MARKWELL & REINMANN-SYSTEM (MARS-System) (MARKWELL et al. 1978) zusammengestellt.

Die Solubilisierung der Thylakoidmembranen erfolgte durch Mischen gleicher Volumina Solubilisierungsmedium und Thylakoidmembransuspension. Die Membranen wurden im Solubilisierungsmedium kurz geschwenkt, und unmittelbar danach bei 49000 g/5 min zentrifugiert. Im Pellet blieben unsolubilisierete Membranfragmente zurück, der Überstand wurde sofort auf die Rundgele aufgetragen (5-8 µl pro Gel).

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das untere Reservoir (Anode) der Elektrophoresekammer mit 12.4 mmol l^{-1} Tris- 96 mmol l^{-1} Glycin gefüllt, das obere Reservoir (Kathode) enthielt den gleichen Puffer mit 0.2% (w/v) Deriphat. Die Elektrophorese erfolgte für 20 Minuten bei 65 V und für weitere 5 Minuten bei 100 V im Dunkeln bei 4°C .

Das apparente Molekulargewicht der Pigment-Protein Komplexe wurde durch Vergleich der elektrophoretischen Mobilität der Komplexe mit denen nicht denaturierter Markerproteine auf dem Plattengel bestimmt.

2.6 Absorptions- und Fluoreszenzspektren

Absorptionsspektren wurden mit einem Aminco DW-2 Spektralphotometer (Aminco, Silver Spring, USA) bei einer Spaltbreite von 3 nm aufgenommen. Die fluorimetrischen Untersuchungen erfolgten mit einem Aminco SPF-500 Fluorimeter bei Raumtemperatur (Spaltbreiten 2-4 nm). Die Proben für die Fluoreszenzmessungen wiesen in der Regel eine Absorbanz von nicht mehr als 0.1 im roten Bereich des chl *a*-Absorptionsspektrums auf.

2.7 Analyse der Polypeptidzusammensetzung

Die Polypeptidzusammensetzung der Thylakoidmembranen und der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* und Spinat wurde nach PICCIONI et al. (1982) bestimmt. Die Auftrennungen erfolgten mit einem Plattengelelektrophoresegerät ProteanTM im NEVILLE-Puffersystem mit einem linearen Acrylamidgradienten von 7.5-15% bei einem 6%igen Sammelgel. Zur Ermittlung ihrer Polypeptidzusammensetzung wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Pigment-Protein-Komplexe aus dem Gel herausgeschnitten, mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator in 50 mmol l^{-1} Tris-HCl (pH 8.0) homogenisiert und nach Abzentrifugation der Gelpartikel mit Hilfe von CENTRISART I-Röhrchen (Type SM 13239) (Sartorius, Göttingen, BRD) konzentriert.

Die Anfärbung der Gele erfolgte mittels Silberfärbung nach WRAY et al. (1981). Dabei wurde zur Untergrundaufhellung nur die Hälfte der im Originalrezept angegebenen Menge der 0.36% NaOH (w/v) in der Versilberungslösung eingesetzt.

2.8 Pigmentanalytik

2.8.1 Pigmentextraktion

Thylakoidmembranen sowie PPC-Präparationen wurden in 80% Aceton (v/v) resuspendiert, in einen Scheidetrichter überführt, mit dem gleichen Volumen Diäthyläther versetzt und vorsichtig geschüttelt. Durch mehrmalige Zugabe des 3-5fachen Volumens kalter 10%iger KCl-Lösung (w/v) (neutralisiert mit Natriumbicarbonat) kommt es zu einer Phasentrennung, wobei die wäßrige Phase abgelassen wird. Die Ätherphase mit den Pigmenten wird durch Überblasen mit hochreinem Stickstoff (Messer Griesheim, Duisburg, BRD) bis zur Trockene eingengt und in Äthanol aufgenommen. Die Aufbewahrung unter N₂ erfolgte in Conic-Ampullen (Macherey & Nagel, Düren, BRD). Bei zusätzlich erforderlicher Wassorentfernung wurden KCl-Kristalle zu den Ätherextrakten gegeben, bzw. der Ätherextrakt bei -20°C für 1-2 h eingefroren.

Zur Herstellung von Pigmentextrakten aus ganzen Zellen von *Gonyaulax* wurden die Zellen zunächst auf einem Glasfaser-Mikrofilter Whatman GF/C gesammelt, in 100% Aceton oder einem Lösungsmittelgemisch aus Methanol und Aceton (3/2, v/v) unter Zugabe von einer Spatelspitze Magnesiumhydroxidcarbonat überführt, und etwa 2-3 min mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Die Zellreste wurden abzentrifugiert, das Pellet mit dem jeweiligen Lösungsmittel reextrahiert und die gesammelten Überstände mit dem gleichen Volumen Diäthyläther versetzt und wie oben beschrieben weiterbehandelt.

2.8.2 Chromatographie

Die Pigmentanalysen erfolgten mit einem Flüssigkeitschromatographen bestehend aus einer Serie 2/2 Gradienten-HPLC Anlage (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA), einem 720 LC-Detektor (Kontron, Zürich, Schweiz), einem M-1 Integrator (Perkin-Elmer) mit Servogor S Potentiometerschreiber (Metrawatt, Nürnberg, BRD), bzw. einem C-R3A Integrator (Shimadzu, Kyoto, Japan).

Die Probenapplikation erfolgte mit 10 µl- und 50 µl-Präzisions-spritzen (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) entweder über ein Probenaufgabeventil mit variablem Volumen (Modell 7105, Rheodyne, Berkeley, CA, USA) oder über ein Aufgabeventil mit Schleifendosierung (Rheodyne 7010).

Die Experimente erfolgten auf 5 μ m Lichrosorb RP-18 und 5 μ m Lichrospher RP-18 Hibar-Fertigsäulen (250 mm Länge x 4.6 mm innerer Durchmesser) (Merck, Darmstadt, BRD).

Die mobile Phase zur Trennung der Pigmente aus *Gonyaulax* bestand aus einem Lösungsmittelgemisch von 88% Acetonitril/Methanol/Tetrahydrofuran (80/15/5, v/v/v) und 12% bidestilliertem Wasser. Die Steigung des Gradienten betrug 1.5 %/min bis zu 100% Lösungsmittelgemisch bei einer Flußrate von 1.5-1.9 ml/min.

Pigmente aus Spinat wurden mit 88% Lösungsmittelgemisch Acetonitril/Methanol/Tetrahydrofuran (75/15/10, v/v/v) und entsprechend bidestilliertem Wasser bei einer Steigung des Gradienten von 1.2%/min und einer Flußrate von 2.0 ml/min getrennt.

2.8.3 Identifizierung der Pigmente

Zur Identifizierung von Pigmenten wurden folgende Verfahren angewendet:

(i) Charakterisierung über Absorptionsspektren, die mit dem Aminco DW-2 Spektralphotometer (Aminco, Silver Spring, MD, USA) aufgenommen wurden. Chlorophylle und Carotinoide wurden anhand der Maxima der im gleichen Lösungsmittel aufgenommenen Spektren aus der Literatur identifiziert.

(ii) Charakterisierung mit Hilfe des Retentionsverhaltens auf der Säule, das abhängig ist von den chemischen Eigenschaften der Pigmente.

2.8.4 Quantitative Bestimmung der Pigmente

Um eine Quantifizierung der Chlorophylle und Carotinoide nach ihrer Auftrennung im rpHPLC-System zu ermöglichen, wurden bekannte Mengen der einzelnen isolierten Pigmente injiziert.

Die Pigmente wurden semi-präparativ unter den angegebenen Bedingungen aufgetrennt, aufgefangen und, je nach Wassergehalt der mobilen Phase, entweder im Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt oder ausgeschüttelt.

Für die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung wurden die verschiedenen Chlorophylle und Carotinoide in das organische Lösungsmittel aufgenommen, für das der zur Eichung verwendete Extinktionskoeffizient (Tabelle 3) gilt. Nur β -Carotin wurde von der Firma Sigma (Deisenhofen, BRD) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen, und in Hexan unter Verwendung des angegebenen Extinktionskoeffizienten (Tab. 3) quantifiziert.

Tabelle 3: Spezifische Extinktionskoeffizienten der Pigmente
aus Gonyaulax polyedra

Pigment	$E_{1\%}^{1\text{cm}}$	Lösungsmittel	Referenz
Chlorophyll c_2	3460	Methanol	1
Peridinin	1325	Äthanol	2
Dinoxanthin	2100	Aceton	3
Diadinoxanthin	2250	Methanol	3
Diatoxanthin	2100	Aceton	3
Chlorophyll a	926	Aceton	4
β -Carotin	2513	Hexan	5

Die Extinktionskoeffizienten gelten für die Carotinoide im Hauptmaximum, für Chlorophyll a im Maximum im roten Bereich (663 nm), für Chlorophyll c_2 bei 440 nm.

Referenzen: 1 MANTOURA & LLEWELLYN (1983); 2 JEFFREY et al. (1975); 3 JOHANSEN et al. (1974); 4 VERNON (1960); 5 vom Lieferanten für die spezifische Probe bestimmt.

Die Eichungen für Chlorophyll c_2 und Peridinin erfolgten isokratisch in der mobilen Phase mit dem Wassergehalt, bei der die Elution von der Säule erfolgte. Alle anderen Pigmente wurden mit 100% des organischen Lösungsmittelgemisches eluiert.

Die Standardabweichungen der ermittelten Peakflächen für die verschiedenen Pigmente bei 10-20 Einspritzungen lagen zwischen 0.5%-3.3%. Die Eichfaktoren für die Xanthophylle wiesen bei 11 Versuchen eine Standardabweichung zwischen 2.1%-4.7% auf, bei den Chlorophyllen und β -Carotin lag die Standardabweichung aufgrund der längeren Retentionszeiten etwas höher, und zwar bei 10 Versuchen zwischen 4.1% und 6.4%.

2.9 Bestimmung der Photosynthesekapazität und der Dunkelatmung

Die Messungen erfolgten polarographisch mit einem Gilson Oxygraphen (Gilson Medical Electr., Middleton, WI, USA) und einer Elektrode vom CLARK-Typ.

Dazu wurden die Zellen auf einem Whatman GF/C-Filter geerntet und in frisches f/2-Medium aufgenommen, so daß die Zellzahl 80000-100000 Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde mit N_2 durchspült. 1.7 ml dieser Suspension wurden zusammen mit 40 μ l 0.425 mmol l⁻¹ Na_2CO_3 -Lösung (Endkonzentration: 10 mmol l⁻¹ Na_2CO_3) in die Meßkammer pipettiert.

Die Brutto-Photosyntheserate der Zellen wurde als photosynthetische O_2 -Produktion bei 20°C (Wasserbadthermostatisierung), sättigendem Weißlicht (300 μ E s⁻¹m⁻², 25000 lux, "Philips PAR 38 Spot", 150 W, Philips, Holland) ermittelt.

Die reelle (Netto)-Photosyntheserate wurde als Summe der Bruttphotosyntheserate und Dunkelatmung abgeschätzt.

Die Bestimmungen des Chlorophyllgehaltes erfolgten spektral-photometrisch nach JEFFREY & HUMPHREY (1975) oder nach rpHPLC-Pigmentanalyse.

2.10 Bestimmung des photosynthetischen Elektronentransportes

Die Elektronentransportraten wurden unter Einsatz spezifischer Elektronendonatoren und -akzeptoren polarographisch mit einer Elektrode vom CLARK-Typ als O_2 -Entwicklung bzw. -Verbrauch ermittelt.

Zur Präparation der Thylakoidmembranen wurden die Zellen von *Gonyaulax* geerntet und aufgebrochen wie in Abschnitt 2.2 beschrieben. Die pelletierten Membranen wurden nur einem Waschschritt in 1 mmol l⁻¹ Tricin-NaOH (pH 7.2), 1 mmol l⁻¹ NaCl, 1 mmol l⁻¹ KCl, 0.5 mmol l⁻¹ $MgCl_2$ unterworfen (SAMUELSSON & PREZELIN 1985).

2.10.1 Gesamtelektronentransport

Die Ermittlung des Elektronentransportes über beide Photosysteme erfolgte als O_2 -Verbrauch mit H_2O als natürlichem Elektronendonator und Methylviologen (MV) als Elektronenakzeptor (Abb. 17). Zusammenstellung des Reaktionsansatzes: 1 mmol l⁻¹ NaN_3 , 1 mmol l⁻¹ MV (Serva), 10 mmol l⁻¹ Tricin-NaOH (pH 7.5), 5 mmol l⁻¹ $MgCl_2$, 10 μ g Chl a ml⁻¹.

2.10.2 PS II-Aktivität

Die PS II-Aktivität wurde als O_2 -Produktion mit Diaminoduren (DAD)/Kaliumhexacyanoferrat ($FeCN$) als Elektronenakzeptorpaar bestimmt. Reaktionsansatz: 0.5 mmol l^{-1} DAD (purum > 99%, Fluka, Buchs, Schweiz) (in eiskalter HCl lösen), 1.5 mmol l^{-1} $FeCN$ (Sigma), 10 mmol l^{-1} Tricin- $NaOH$ (pH 7.5), 5 mmol l^{-1} $MgCl_2$, $10 \text{ } \mu\text{g Chl a ml}^{-1}$.

2.10.3 PS I-Aktivität

Zur Ermittlung der PS I-Aktivität als O_2 -Verbrauch wurden zwei Reaktionsansätze eingesetzt. Methylviologen dient auch hier jeweils als Endakzeptor. Ein Ansatz verwendet das Elektronendonorpaar-System Na-Ascorbat (ASC)/2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP). Reaktionsansatz: 1 mmol l^{-1} NaN_3 , $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ DCMU (99% Pestanal, Riedel de Haen, Seelze, BRD), 5 mmol l^{-1} Na-Ascorbat (BDH), $5 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ DCPIP (Sigma), 1 mmol l^{-1} MV, 10 mmol l^{-1} Tricin- $NaOH$ (pH 8.0), $5 \text{ } \mu\text{g Chl a ml}^{-1}$.

Im zweiten Reaktionsansatz wird der Plastochinon-Pool in die Messung einbezogen. Reaktionsansatz: 1 mmol l^{-1} NaN_3 , $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ DCMU, 2 mmol l^{-1} Durohydrochinon, 1 mmol l^{-1} MV, 10 mmol l^{-1} Tricin- $NaOH$ (pH 7.5), $5 \text{ } \mu\text{g Chl a ml}^{-1}$. Zur Herstellung von Durohydrochinon werden 16.4 mg Durochinon (purum, Fluka) unmittelbar vor der Messung in 1 ml einer eiskalten 1/1-Lösung aus Methanol/Äthylenglykol (v/v) mit 2.1 mg $Na(BH_4)$ gelöst, nach etwa fünf Minuten in Eis ist die Reduktion abgeschlossen, durch Zugabe von $5 \text{ } \mu\text{l}$ konz. HCl wird das Hydrochinon stabilisiert und überschüssiges BH_4^- hydrolysiert (IZAWA & PAN 1978).

2.11 Fluoreszenzinduktionsmessungen

2.11.1 Durchführung

Die Messungen wurden nach SCHEFFCZYK (1986) mithilfe eines Aminco DW-2 Spektralphotometers mit Seitenlichteinrichtung durchgeführt. Die Induktionskurven wurden auf einem Speicheroszilloskop (Nicolet Instruments Corporation, Model 200) aufgezeichnet. Die Seitenlichteinrichtung am Photometer induzierte ein Anregungslicht von 1.5 W m^{-2} (gemessen mit LI-COR-Integrating Quantum Radiometer LI-188 B mit Pyranometer Sensor, Lincoln, NE, USA), das die Fluoreszenzinduktion der Algensuspension bewirkte.

Das Anregungslicht wurde entweder mit einem Filter SFK 11 oder mit einem Filter BG 39 (in Kombination mit dem farblosen Wärmeabsorptionsfilter KG 1) (alle Schott, Mainz, BRD) gefiltert. Der Grünfilter SFK 11 läßt Licht zwischen 516 nm und 570 nm durch, mit einem Transmissionsmaximum von 27% bei 546 nm. Der Blaugrünfilter BG 39 ist durchlässig für Licht zwischen 340 bis 620 nm, mit einer maximalen Transmission von 46% bei 506 nm (mit KG 1). Im Meßstrahl befand sich der Filter RG 665 (Schott), der für Wellenlängen oberhalb von 665 nm durchlässig ist.

Gonyaulax-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase ($4500-10000$ Zellen ml^{-1}) wurden eine halbe Stunde vor den Meßzeitpunkten geerntet, die Zellzahl auf 5000 Zellen ml^{-1} eingestellt und die Zellen für 30 min mit $12.5 \mu\text{mol l}^{-1}$ DCMU dunkelinkubiert. Eine Minute vor der Messung wurde der jeweiligen Probe $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ Hydroxylamin zugegeben.

2.11.2 Quantitative Auswertung

MELIS & HOMANN (1975, 1976) konnten zeigen, daß die Flächenzunahme oberhalb einer Induktionskurve in DCMU-behandelten, dunkeladaptierten Chloroplasten aus höheren Pflanzen ein Maß für die Umwandlung von offenen zu geschlossenen Reaktionszentren des Photosystems II ist, und direkt proportional zum photo-reduzierten Q ist (MELIS & DUYSSENS 1979).

Zur Analyse der Fluoreszenzinduktion wurden für jede Kurve 77 Datenpaare ($X(I)$ = Beobachtungszeitpunkt in ms; $Y(I)$ = Fluoreszenz (rel.) in mV) manuell vom Speicheroszilloskop übernommen, und die Fläche unterhalb der Induktionskurven mit der SIMPSON-Regel bestimmt. Sie erhält für die Berechnung jedes Zwischenintervalls (Z) (Anzahl der Subintervalle von $n = 2$) die Form

$$Z = \frac{h}{3} (Y(I) + 4Y(I + 1) + Y(I + 2)) \quad (1)$$

mit der Schrittweite

$$h = \frac{X(I + n) - X(I)}{n} \quad (2)$$

Nach der Flächenberechnung verbleiben 38 Zwischenintervalle, ihre Summe über die zu integrierende Beobachtungszeit von 4 s ergibt dann die Gesamtfläche unterhalb der Induktionskurve.

Nach der Bestimmung der maximalen Fluoreszenz $F_{\max}$ (Mittelwert aus den letzten 15 Y-Werten der Induktionskurve) können die Flächen $A(t)$ und die Gesamtfläche $A_{\max}$ oberhalb der Kurve berechnet werden.

Diese Flächen werden einer Analyse 1. Ordnung unterzogen (MELIS & HOMANN 1976):

$$\ln \frac{A_{\max} - A(t)}{A_{\max}} \quad (3)$$

Trägt man die Ergebnisse aus (3) gegen die Zeit auf, so wird der biphasische Charakter der Flächenzunahme oberhalb der Induktionskurve deutlich.

Die langsame exponentielle Phase (β -Komponente), die dem PS II $_{\beta}$ zugeordnet wird, ergibt eine Gerade, deren Steigung der Geschwindigkeitskonstante k_{β} entspricht. Der Schnittpunkt der verlängerten Geraden mit der y-Achse ist der natürliche Logarithmus des prozentualen Anteils der β -Zentren ($\beta_{\max}$).

Die Analyse der schnellen Phase (α -Komponente) der Induktionskinetik wird durch Subtraktion der langsamen exponentiellen Phase von der Gesamtkinetik erreicht.

Zunächst wird derjenige Anteil der Gesamtfläche oberhalb der Induktionskurve ermittelt, der zu jedem Zeitpunkt t dem kinetisch langsameren PS II $_{\beta}$ zugeordnet werden kann (MELIS & AKOYUNOGLU 1977):

$$\beta(t) = \beta_{\max} \times (1 - e^{-k_{\beta} \times t}) \quad (4)$$

Dann werden diese Flächenanteile von der korrespondierenden Gesamtfläche zum Zeitpunkt t , $A(t)$, subtrahiert, um den Flächenanteil von PS II $_{\alpha}$ zu jedem Zeitpunkt zu erhalten:

$$\alpha(t) = A(t) - \beta(t) \quad (5)$$

Die Geschwindigkeitskonstante k_{α} des $PS II_{\alpha}$ ergibt sich aus der Anfangssteigung der semilogarithmischen Analyse des schnellen Teils der Induktionskurve (MELIS & ANDERSON 1983):

$$\ln \frac{\alpha_{\max} - \alpha(t)}{\alpha_{\max}} \quad (6)$$

3. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel werden zunächst die Ergebnisse zur molekularen Organisation der Pigment-Protein-Komplexe aus den Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* und Spinat dargestellt. Dazu gehören neben der Trennung und Identifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus *Gonyaulax* (Abschnitt 3.1), die Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe mittels Deriphat-PAGE, sowie die Charakterisierung der membran-intrinsischen und wasserlöslichen Pigment-Proteine hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften, ihres Pigmentmusters und ihrer Polypeptidausstattung (Abschnitte 3.2 und 3.3). Die Pigment- und Polypeptiddaten machen eine Identifizierung der einzelnen Komponenten als PS I-, PS II- und Antennenkomplexe möglich.

Im anschließenden Abschnitt (3.4) werden die Ergebnisse der Versuche zur circadianen Rhythmik zusammengefaßt. Neben den Messungen zur Photosynthesekapazität und dem Pigmentgehalt ganzer Zellen (Abschnitt 3.4.1) sowie zum photosynthetischen Elektronentransport (3.4.2) erlauben die Ergebnisse aus den Untersuchungen der Pigmentzusammensetzung der PPC aus *Gonyaulax* (Abschnitt 3.4.3) zusammen mit den Analysen der PS II-Struktur mittels Fluoreszenzinduktion (3.4.4) Aussagen über strukturelle und funktionelle Veränderungen des Photosyntheseapparates, die Grundlage für eine wechselnde Effektivität in der Lichtverarbeitung sein können.

3.1 Trennung und Identifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus *Gonyaulax polyedra*

Die Organismen, welche unter der Klassifikation 'Algen' zusammengefaßt werden, zeigen eine große Vielfalt hinsichtlich ihrer Pigmentausstattung. Immerhin findet man über 60 verschiedene Carotinoide in Algen, wobei jede Algenklasse 4-5 Xanthophylle enthält. Alle Algen enthalten die Pigmente Chl a und β -Carotin, die als essentiell für die Photosynthese sauerstoffentwickelnder Organismen angesehen werden (LARKUM & BARRETT 1983, ANDERSON & BARRETT 1986). Die wichtigsten marinen Algenklassen (Cryophyceae, Dinophyceae, Diatomeae und Phaeophyceae) enthalten die Chlorophylle c_1 und/oder c_2 , und als hauptsächliche Xanthophylle Fucoxanthin oder Peridinin. Unter diesen Chl a/c-Carotinoid-Pigmentsystemen enthalten Dinoflagellaten neben Chl a als weiteres Chlorophyll ausschließlich Chl c_2 , und Peridinin anstelle von Fucoxanthin.

Es werden nur wenige Ausnahmen von diesen für Dinoflagellaten typischen Charakteristika in der Pigmentausrüstung berichtet. Es gibt Dinoflagellaten, die Fucoxanthin anstelle von von Peridinin und beide Chl *c*-Typen enthalten (RILEY & WILSON 1967, MANDELLI 1968), solche Arten, die zwar Peridinin, aber ebenfalls Chl *c*₁ und Chl *c*₂ besitzen (JEFFREY et al. 1975, DURAND & BERKALOFF 1985), und eine Art, die Chl *a* und Chl *b* enthält (WATANABE et al. 1987).

Zusätzlich zum Peridinin enthalten Dinoflagellaten weitere Carotinoide. Dabei scheint β -Carotin als einziges Carotin vorhanden zu sein (JEFFREY 1968). Zur Xanthophyllausstattung von Dinoflagellaten gibt es widersprüchliche Angaben. STRAIN et al. (1944) berichten, daß mit Peridinin die Xanthophylle Diadinoxanthin und Dincoxanthin, sowie einige Carotinoide in kleineren Mengen assoziiert sind. Demgegenüber nehmen JOHANSEN et al. (1974) Diatoxanthin, Pyrrhoxanthin, Dincoxanthin und Peridininol als regelmäßig auftretende Xanthophylle photosynthetisch aktiver Dinoflagellaten an. Häufig wurde über das Vorhandensein unidentifizierter Carotinoide berichtet, von denen einige Cis-Isomere sein könnten (STRAIN et al. 1944, JEFFREY 1968, LOEBLICH & SMITH 1968). Die Arbeiten von LOEBLICH & SMITH (1968), JOHANSEN et al. (1974) und JEFFREY et al. (1975) geben Übersichten über die Pigmentausrüstungen einiger Dinoflagellaten.

Zusammenfassend lassen sich jedoch keine abschließenden Aussagen zur Vielfalt der Pigmentausrüstung in Dinoflagellaten machen. Ein Grund dafür mag sein, daß bisher nur wenige Dinoflagellaten hinsichtlich ihrer Pigmentausrüstung untersucht worden sind und kaum HPLC-Pigmentanalysen für marine Algen vorliegen (vergl. MANTOURA & LLEWELLYN 1983, WRIGHT & SHEARER 1984).

Die Abbildung 2 zeigt die Trennung der Chlorophylle und Carotinoide eines Pigmentextraktes aus Zellen und aus Thylakoidmembranen von *Gonyaulax polyedra*. Mit dem chromatographischen System können sieben Pigmente aufgetrennt werden. In Tabelle 4 sind die Daten zur Identifizierung der Pigmente zusammengefaßt. Der Dinoflagellat *Gonyaulax polyedra* enthält die Chlorophylle *a* und *c*₂, die Xanthophylle Peridinin, Dincoxanthin, Diadinoxanthin und Diatoxanthin, und als Carotin ausschließlich β -Carotin. Die Strukturen dieser Pigmente sind in Abbildung 3 dargestellt.

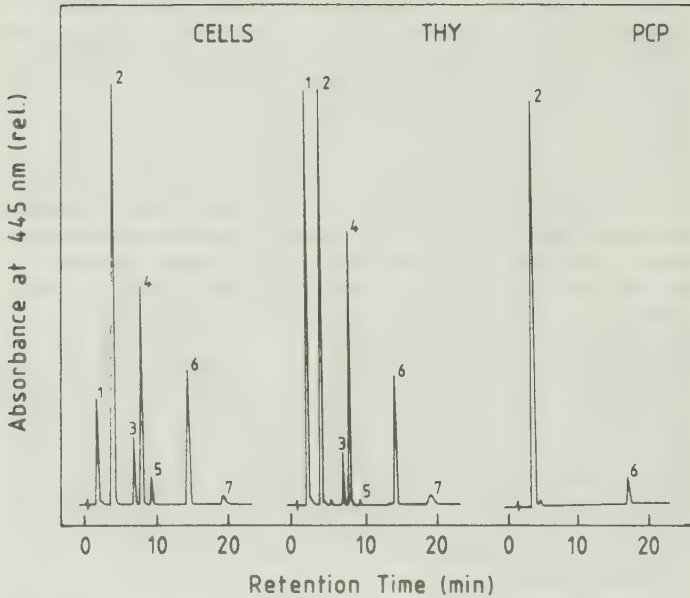


Abb. 2: Chromatogramme der Pigmentextrakte aus Zellen, Thylakoidmembranen (THY) und dem wasserlöslichen Peridinin-Chl *a*-Protein (PCP) von *Gonyaulax polyedra*.
Pigmentidentifizierung: 1 Chlorophyll c_2 , 2 Peridinin, 3 Dinoxanthin, 4 Diadinoxanthin, 5 Diatoxanthin, 6 Chlorophyll *a*, 7 β -Carotin. Chromatographische Bedingungen siehe Text.

Daß die Trennleistung des rpHPLC-Systems noch nicht erschöpft ist, zeigt die Abbildung 7, wo neben den sieben Pigmenten weitere Peaks erscheinen, die zum größten Teil Abbauprodukte dieser Pigmente darstellen. So eluieren als wichtigste Chl *a*-Isomere vor dem Chl *a* das Chl *a*-Allomer, unmittelbar nach dem Chl *a* das Chl *a*-Epimer (WRIGHT & SHEARER 1984), das in stöchiometrischem Verhältnis zum Reaktionszentrum-Chlorophyll des Photosystems I, P700, vorkommen soll (WATANABE et al. 1987).

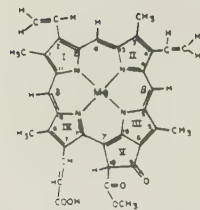
Tabelle 4: Identifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus *Gonyaulax polyedra*

Peak Nr. Pigment	Spektrale Daten (gefunden)		Lösungs- mittel	Spektrale Daten (berichtet)		Referenzen
	Maxima (nm)	Peak- verhältnis*		Maxima (nm)	Peak- verhältnis*	
1 Chl c_2	<u>446</u> , 585, 631	-	HPLC-mobile Phase			
	450, 582, 630	9.68	Aceton	444, 6, -	629.6	1
	450, 587, 635	8.94	Methanol	450, 588, 635	-	2
2 Peridinin	476	-	HPLC-mobile Phase			
	461 ⁺ , <u>476</u>	-	Athanol Äthanol	475 <u>474</u>	-	3 4
3 Dinoxanthin	<u>442</u> , 471.5	-	HPLC-mobile Phase			
	419, 443, 472	95	Aceton	418, 442, 470	-	5
	419, 444, 473	94	Aceton			
4 Diadinoxanthin	448, 478	-	HPLC-mobile Phase			
	421 ⁺ , <u>445</u> , 474	86	Methanol	338, 444.5, 474	54	5
			Äthanol	424, <u>445</u> , 476	-	6
5 Diatoxanthin	454, 482	-	HPLC-mobile Phase			
	<u>452</u> , 480	75	Aceton	452, 479	-	5
	432, 663	-	HPLC-mobile Phase			
6 Chl <u>a</u>	<u>431</u> , 663	1.25	Aceton	430, 663	-	7
			80% Aceton	433, 665	1.21	7
7 β -Carotin	<u>451</u> , 478	-	Hexan	428, <u>449</u> , 477	-	6
			Hexan	425, <u>450</u> , 476	-	8

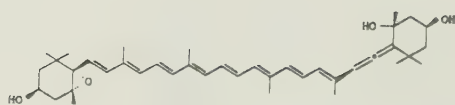
* Das Peakverhältnis bezeichnet bei den Carotinoiden das III/II-Verhältnis, d.h., das Verhältnis zwischen dem langwelligsten Maximum III und dem Hauptmaximum II (unterstrichen) in %. Bei den Chlorophyllen bezeichnet das Peakverhältnis die Soretbanden-Absorbanz im blauen Bereich dividiert durch die maximale Absorbanz in der roten Region.

⁺ Nur als Schulter ausgebildet

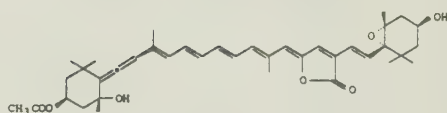
Referenzen: 1 JEFFREY (1972); 2 SWEENEY et al. (1959); 3 STRAIN et al. (1944); 4 JEFFREY (1968); 5 JOHANSEN et al. (1974); 6 JEFFREY et al. (1975); 7 SVEC (1978); 8 FÖPPEN (1971).



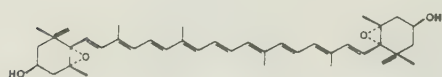
Chlorophyll c_2



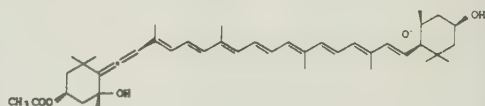
Neoxanthin



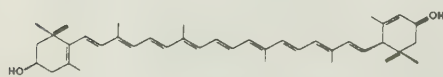
Peridinin



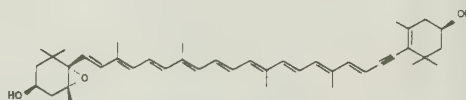
Violaxanthin



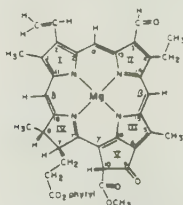
Dinoxanthin



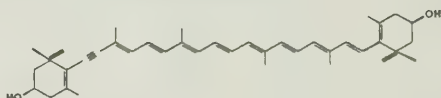
Lutein



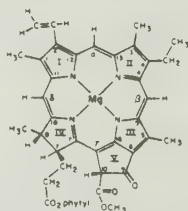
Diadinoxanthin



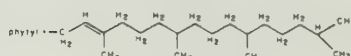
Chlorophyll b



Diatoxanthin



Chlorophyll a



β -Carotene

Abb. 3: Strukturformeln von Chlorophyllen und Carotinoiden aus *Gonyaulax* und Spinat (aus SVEC 1978, STRAUB 1987). Reihenfolge gemäß ihrer Elution von der Säule nach der rpHPLC-Auftrennung.

Hinter dem Peridinin-Peak erscheint ein Peridinin-Abbauprodukt, das das gleiche Absorptionsspektrum wie die Muttersubstanz aufweist, aber nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Obwohl bereits einige strukturelle Variationen des Peridinins gefunden wurden, konnte keines dieser Degradationsprodukte eindeutig zugeordnet werden (JOHANSEN et al. 1974).

Prinzipiell ist die chromatographische Analyse durch das Vorhandensein der 5,6-Epoxidgruppen in Peridinin, Dinoxanthin und Diadinoxanthin erschwert, da diese sich leicht zu 5,8-Epoxiden umorientieren. Das ist vor allem bei Vorhandensein von verdünnten Säuren der Fall, so daß eigene quantitative HPLC-Auftrennungen dieser Pigmente mit mobilen Phasen, die Äthylacetat enthielten (WRIGHT & SHEARER 1984) durch diese Isomerisierung beeinträchtigt waren, da im Äthylacetat noch immer geringe Mengen von Essigsäure vorhanden sind.

3.2 Auftrennung und Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax*

3.2.1 Die membran-intrinsischen Pigment-Protein-Komplexe

Die Thylakoidmembranen von Dinoflagellaten sind, genauso wie die der Algenklassen der Chryptophyceae, Crysohyceae, Diatomeae und Phaeophyceae, für die zur Solubilisierung und Isolierung von PPC aus Thylakoidmembranen höherer Pflanzen eingesetzten Detergenz/Chl-Verhältnisse nicht zugänglich. In der Regel führen erst wesentlich höhere Verhältnisse zu einer ausreichenden Solubilisierung der Thylakoidmembranen dieser Organismen (BARRETT & ANDERSON 1980, BOZZAR et al. 1980, ALBERTE et al. 1981, INGRAM & HILLER 1983).

Im Verlauf von Vorversuchen wurden die anionischen Detergenzien Natriumdodecylsulfat (SDS), Desoxycholol und Taurodesoxycholol, die nichtionischen Detergenzien Triton X-100 und Octylglucosid, das zwitterionische Detergenz CHAPS, sowie Mischungen dieser Detergenzien zur Solubilisierung der Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* eingesetzt. In Verbindung mit dem zur Auftrennung von PPC aus den Grünalgen *Chlorella* und *Chlamydomonas* erfolgreich eingesetzten SDS-PAGE System (KNOETZEL et al. 1988) konnten jedoch nur eine grüne Bande geringer elektrophoretischer Mobilität und freie Pigmente aufgetrennt werden. Erst mit dem

Einsatz des zwitterionischen Detergenz Deriphat anstelle von SDS in der Elektrophorese (MARKWELL et al. 1978, MARKWELL et al. 1979) konnte eine Stabilisierung der PPC während der elektrophoretischen Auftrennung erreicht werden.

Die Trennung der membran-intrinsischen PPC aus *Gonyaulax* mit Hilfe einer modifizierten Deriphat-PAGE ist in Abbildung 4 dargestellt. Die Komplexe wurden nach ansteigender elektrophoretischer Mobilität als PPC I, PPC II, PPC III, PPC IV und PPC V bezeichnet, die ermittelten apparanten Molekulargewichte der Komplexe sind angegeben. Zusätzlich tritt eine Bande mit freiem Pigment (FP) auf.

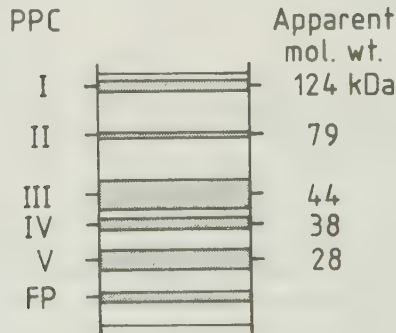


Abb. 4: Schematische Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe nach Deriphat-PAGE solubilisierter Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax*.

Da mit Hilfe des (MARS)-Systems elektrophoretische Auftrennungen ohne FP beschrieben wurden (MARKWELL et al. 1978, MARKWELL et al. 1979, BOCZAR et al. 1980) ist es zunächst nicht zu entscheiden, ob die am weitesten ins Gel gewanderte Zone ein PPC oder freies Pigment ist. Deshalb wurden solubilisierete Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* bei etwa 80°C für wenige Minuten erhitzt und das entstehende freie Pigment wurde als Referenz benutzt, so daß die unterste Bande im Gel eindeutig als FP identifiziert werden konnte.

In Abbildung 5 sind die Raumtemperatur-Absorptionsspektren der Thylakoidmembranen von *Gonyaulax*, des wasserlöslichen Peridinin-Chl a-Proteins und der membran-intrinsischen PPC zusammengefaßt. Obwohl die Aufnahme von Absorptionsspektren von

PPC die am häufigsten benutzte Charakterisierungsmethode detergentenfraktionierter Thylakoidmembranen ist - die meisten Reaktionszentrum-PPC zeigen nach ihrer Isolierung keine photochemische Aktivität mehr -, bleibt doch ihre Beziehung zur *in vivo* Absorbanz fraglich. Veränderungen der molekularen Umgebung als Folge der zur Solubilisierung benutzten Detergenzien führen zu einer Beeinträchtigung der Wechselwirkungen von Pigmentmolekülen und Protein sowohl zwischen als auch innerhalb von PPC und dabei vor allem zu Verschiebungen der Maxima in der roten Region des Chl-Spektrums (650-700 nm). Dennoch können Absorptionsspektren auf das Vorhandensein bestimmter Pigmente und ihre Verhältnisse untereinander hinweisen.

In Abbildung 6 sind Fluoreszenzexcitations- und Emissionsspektren einiger ausgewählter Pigment-Proteine dargestellt, die Informationen darüber geben sollen, welche akzessorischen Pigmente zur Fluoreszenzemission beitragen und damit am Excitonentransfer zu den Chlorophyllen des Photosystems I und II teilnehmen.

Aus den in Abbildung 7 dargestellten Chromatogrammen und der Tabelle 5 sind die Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzungen der Thylakoidmembranen und der Pigment-Protein-Komplexe von *Gonyaulax* zu entnehmen. Die Ergebnisse lassen erkennen, daß die Verteilung der Pigmente auf die PPC sehr heterogen ist. In Abb. 8 sind die Ergebnisse der Polypeptidanalysen der Thylakoidmembran und der Pigment-Protein-Komplexe von *Gonyaulax* dargestellt.

Das Absorptionsspektrum des grün gefärbten PPC I ist charakterisiert durch die Chl *a*-Maxima bei 438 und 672 nm (Abb. 5), sowie eine ausgeprägte Schulter bei 485 nm, für die wahrscheinlich β -Carotin verantwortlich ist (BOCZAR & PREZELIN 1987). Im Emissionsspektrum (Abb. 6) zeigt sich ein Maximum bei 678 nm, im Excitationsspektrum zeigt sich die Soret-Bande des Chl *a* (438 nm). Daneben tritt im Emissionsspektrum ein deutliches Maximum bei 644 nm auf, das auf vom Energie-Transfer entkoppeltes Chl c_2 hindeutet. Das Absorptionsspektrum des PPC II (Abb. 5) ähnelt weitgehend dem des PPC I, und auch die aus den Chromatogrammen (Abb. 7) abgeleitete relative Pigmentzusammensetzung (Tab. 5) zeigt, daß PPC I und PPC II nahezu identische Pigmentmuster besitzen. Beide Komplexe sind im Vergleich zu Thylakoidmembranen mit β -Carotin gegenüber Chl *a* angereichert, was aus den Chl *a*/ β -Carotin-Verhältnissen deutlich wird. Der Chl c_2 - und

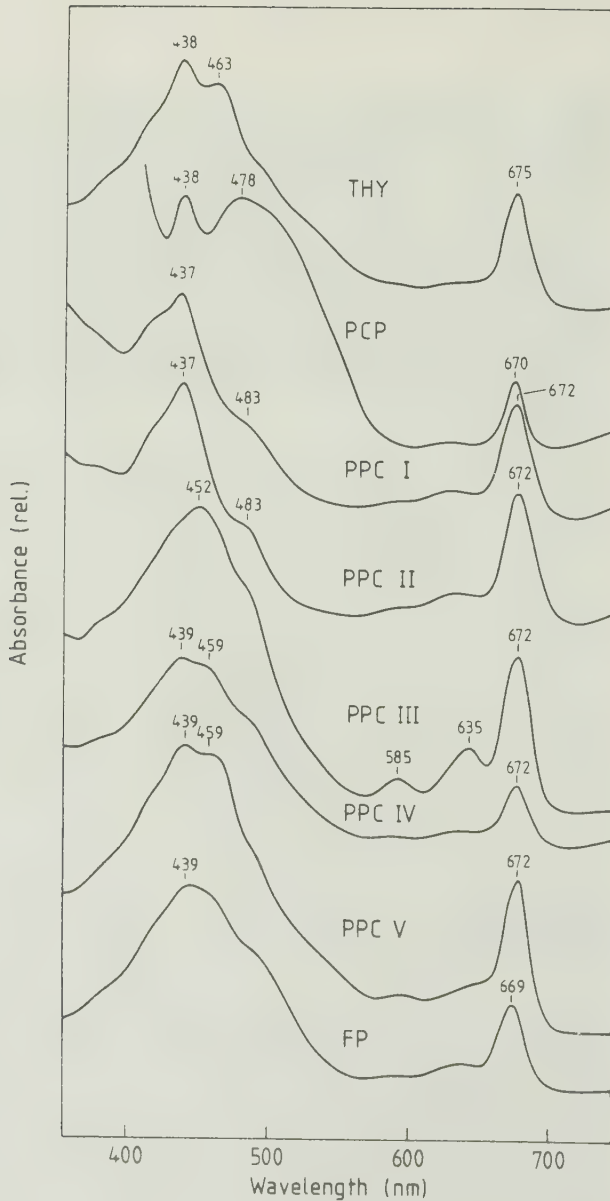


Abb. 5: Absorptionsspektren der Thylakoidmembran, der membran-intrinsischen und des wasserlöslichen Pigment-Protein-Komplexes aus *Gonyaulax*. Die Spektren der membran-intrinsischen PPC wurden unmittelbar nach ihrer elektrophoretischen Auftrennung von den Gelscheiben aufgenommen.

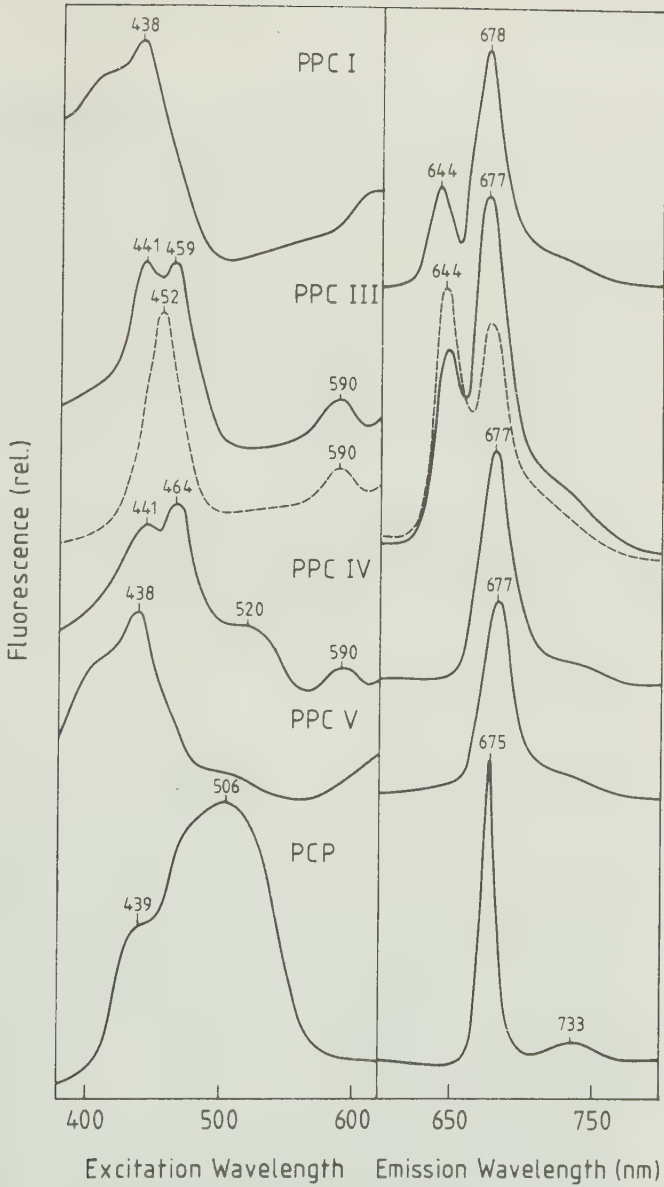


Abb. 6: Fluoreszenzexcitations und -emissionsspektren ausgewählter Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax*.
Excitation: 438 nm, 452 nm (PPC III). Emission bei der angegebenen Wellenlänge.

Peridiningehalt von PPC I beispielsweise ist gegenüber Thylakoidmembranen stark vermindert (3.31 Moleküle Chl c_2 /100 Moleküle Chl a gegenüber 20.23 Molekülen Chl c_2 /100 Molekülen Chl a bzw. 14.67 Moleküle Peridinin/100 Moleküle Chl a gegenüber 75.10 Molekülen Peridinin/100 Molekülen Chl a) (Tab. 5). Diadinoxanthin ist das mengenmäßig am stärksten vertretene Xanthophyll innerhalb der PS I-Komplexe, es macht in PPC I und II jeweils über die Hälfte der gebundenen Xanthophylle aus. Insgesamt wird aus den Chl a /Xan-Verhältnissen deutlich, daß PPC I und II jeweils etwa halb so viele Xanthophylle pro Chl a binden wie Thylakoidmembranen, in denen etwa gleich viel Xanthophylle und Chlorophylle gebunden sind (Tab. 5). Etwa 20% des gesamten Chl a ist in diesen beiden Banden lokalisiert.

Die Pigmentmuster, die Lage der Banden im Gel und ihre spektralen Eigenschaften deuten auf eine Anreicherung des PS I in diesen Banden hin (vergl. PREZELIN & ALBERTE 1978, BOCZAR et al. 1980). Die Anwesenheit von Xanthophyllen zeigt, daß Antennenkomplexe Bestandteil des PS I-Suprakomplexes sind.

Die Polypeptidanalyse der beiden gemeinsam eluierten Komplexe ergab Polypeptide der Molekulargewichte von 53 kDa, 31 kDa und 18.1 kDa (Abb. 8).

Das Absorptionsmaximum des rot-braunen PPC III im blauen Bereich bei 452 nm sowie die Maxima bei 585 und 635 nm können auf den hohen Gehalt an Chl c_2 zurückgeführt werden (Abb. 5). Auch in diesem Komplex liegt das Chl a -Maximum im roten Bereich bei 672 nm. Peridinin scheint hier für die 485 nm-Schulter im Absorptionsspektrum verantwortlich zu sein. Im Fluoreszenzexcitationsspektrum für die Chl a -Emission (Abb. 6) zeigt sich, daß sowohl Chl c_2 (459, 590 nm) als auch Peridinin am Energietransfer auf Chl a teilnehmen. Aber genauso wie im PPC I deutet auch im PPC III der 640 nm-Peak im Emissionsspektrum darauf hindeutet, daß ein Teil des Chl c_2 vom Energietransfer auf Chl a entkoppelt ist. Das Excitationsspektrum für die Chl c_2 -Emission zeigt ein Maximum bei 452 und 550 nm (Abb. 6).

Nach Solubilisierung der Thylakoidmembranen mit SDS enthalten die Fluoreszenzemissionsspektren der PPC I und III neben der Chl a -Komponente (677 nm) auch das 644 nm-Maximum des Chl c_2 , während im Excitationsspektrum nach Anregung bei 438 nm sowohl die Soret-Bande des Chl c_2 als auch die für Peridinin charakteris-

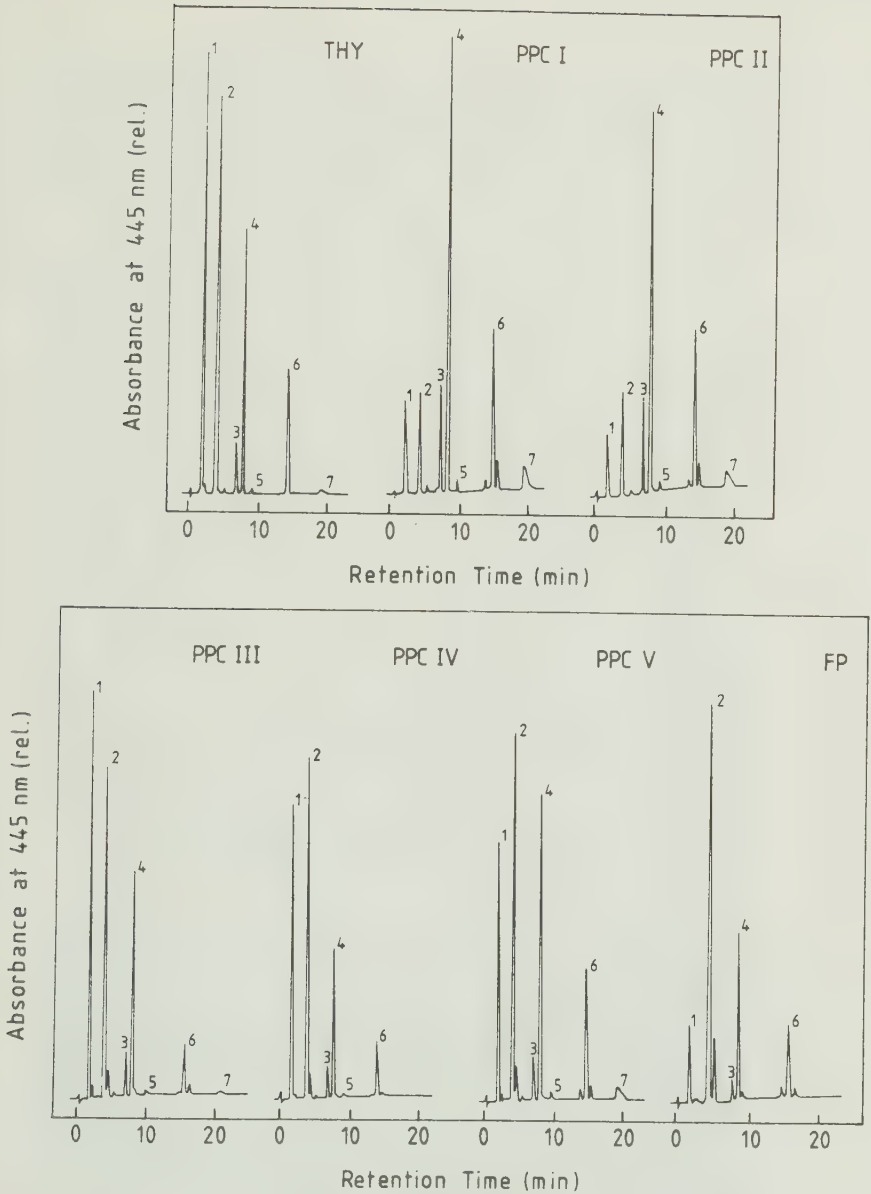


Abb. 7: Chromatogramme der Pigmentextrakte aus der Thylakoidmembran (THY) und der membran-intrinsischen Pigment-Protein-Komplexe (PPC) aus *Gonyaulax*.
Pigmentidentifizierung: 1 Chlorophyll c_2 , 2 Peridinin, 3 Dinoxanthin, 4 Diadinoxanthin, 5 Diatoxanthin, 6 Chlorophyll a, 7 β -Carotin. Chromatographische Bedingungen siehe Text.

Tabelle 5: Relative Pigmentzusammensetzung (mol/100 mol Chl a) und molare Pigmentverhältnisse (mol/mol) der Thylakoidmembran und der Pigment-Protein-Komplexe aus Conyulax polyedra.

Pigment	THY	PCP	PPC I	PPC II	PPC III	PPC IV	PPC V	fP
Chlorophyll a	20.23 $\pm$ 1.55	-	3.31 $\pm$ 1.23	2.91 $\pm$ 1.56	32.99 $\pm$ 4.56	23.12 $\pm$ 2.59	10.83 $\pm$ 0.17	13.40 $\pm$ 0.91
Peridinin	75.10 $\pm$ 11.37	441 $\pm$ 61	14.67 $\pm$ 1.45	14.12 $\pm$ 1.67	140.96 $\pm$ 10.60	121.20 $\pm$ 15.83	70.52 $\pm$ 13.25	188.70 $\pm$ 7.15
Dinoxanthin	6.41 $\pm$ 0.44	-	8.07 $\pm$ 0.96	7.27 $\pm$ 1.05	10.69 $\pm$ 0.90	9.35 $\pm$ 1.47	5.68 $\pm$ 1.76	3.75 $\pm$ 0.35
Diadinoxanthin	24.98 $\pm$ 3.81	-	30.80 $\pm$ 5.71	24.78 $\pm$ 5.47	42.47 $\pm$ 5.55	27.38 $\pm$ 3.14	28.45 $\pm$ 2.10	29.85 $\pm$ 2.86
Diatoxanthin	0.93 $\pm$ 0.54	-	1.12 $\pm$ 0.75	0.85 $\pm$ 0.28	2.03 $\pm$ 0.83	0.95 $\pm$ 0.45	0.91 $\pm$ 0.66	1.28 $\pm$ 0.12
β -Carotin	2.00 $\pm$ 0.21	-	10.83 $\pm$ 0.46	10.50 $\pm$ 3.66	1.99 $\pm$ 0.78	-	4.41 $\pm$ 0.59	-
Verhältnisse								
Chl a / β -Car	50.28 $\pm$ 5.33	-	9.25 $\pm$ 0.39	10.14 $\pm$ 3.54	44.66 $\pm$ 11.12	-	22.88 $\pm$ 3.08	-
Chl a / c_2	4.97 $\pm$ 0.37	-	32.79 $\pm$ 10.29	40.24 $\pm$ 21.65	3.08 $\pm$ 0.40	4.37 $\pm$ 0.54	9.23 $\pm$ 0.14	7.48 $\pm$ 0.51
Chl a /Xan	0.94 $\pm$ 0.10	-	1.82 $\pm$ 0.21	2.16 $\pm$ 0.36	0.52 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.10	0.96 $\pm$ 0.12	0.45 $\pm$ 0.02
Peridinin/Chl a	0.75 $\pm$ 0.11	4.41 $\pm$ 0.61	0.15 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.02	1.41 $\pm$ 0.11	1.21 $\pm$ 0.16	0.70 $\pm$ 0.13	1.88 $\pm$ 0.07

Daten (Mittelwerte mit Standardabweichung) aus vier unabhängigen Experimenten.

Abkürzungen: Chl, Chlorophyll; β -Car, β -Carotin; Xan, Xanthophylle; THY, Thylakoidmembran; fP, freies Pigment; PPC, Pigment-Protein-Komplex.

tischen Absorbanzen verschwinden. Das zeigt, daß der Energietransfer von Chl c_2 und Peridinin zum Chl a durch Detergenzbehandlung sehr schnell beeinträchtigt wird (FRIEDMAN & ALBERTE 1984). In einigen Fällen konnte sogar ein hypsochromer Shift der Soret-Bande des Chl a nach 430 nm beobachtet werden.

Die Pigmentanalyse des PPC III (Abb. 7 u. Tab. 5) ergab, daß in diesem Komplex große Mengen von Chl c_2 und Peridinin angereichert sind. Das wird deutlich aus den Verhältnissen Chl a/c_2 und Chl a/Xan , die jeweils nur halb so groß sind wie in Thylakoidmembranen, während sich das Peridinin/Chl a -Verhältnis verdoppelt hat (Tab. 5). Nahezu 60% des gesamten Chl c_2 der Thylakoidmembran ist in diesem Komplex lokalisiert, so daß man auf eine Anreicherung des für Dinoflagellaten postulierten Chl a/c_2 -Antennenproteins (BOCZAR et al. 1980, PREZELIN 1987) in dieser Bande schließen kann. Hauptpolypeptid dieses Antennenkomplexes soll ein 19 kDa-Protein sein (BOCZAR & PREZELIN 1987); der hier isolierte Komplex enthielt Polypeptide von 70 und 74 kDa, Proteine in der 41-50 kDa-Region, sowie Polypeptide der Molekulargewichte von 32 kDa, 28.5 kDa und eben von 19.1 kDa (Abb. 8).

Die Absorptionsspektren der PPC IV und V (Abb. 5) sind durch Maxima bei 438, 459 und 672 nm gekennzeichnet. Im Excitationspektrum des PPC IV zeigen die Maxima bei 441, 464 sowie bei 520 nm die Beteiligung von Chl c_2 (450-460 nm) sowie des Peridins (460-520 nm) am Energietransfer zum Chl a . Im Emissionsspektrum tritt ein Maximum bei 677 nm auf. Das Fluoreszenzemissionsspektrum des PPC V ähnelt dem des PPC IV, das Maximum liegt hier bei 678 nm, während im Excitationsspektrum nur die Soret-Bande des Chl a bei 438 nm erkennbar ist.

PPC IV ist ein im Vergleich mit Thylakoidmembranen mit Xanthophyllen, insbesondere Peridinin, angereicherter Komplex, der kein β -Carotin enthält (Tab. 5). So kann er als Komplex mit Antennenfunktion angesehen werden, analog den Chl a/c -Fucoxanthin-Komplexen aus Braunalgen, die dort hauptsächlich Lichtsammelfunktion haben (LARKUM & BARRETT 1983). Die Polypeptidanalyse ergab Proteine in der 41-50 kDa-Region, daneben bindet der Komplex Polypeptide von 32 kDa, 28.5 kDa und 19.1 kDa (Abb. 8).

Die Pigmentzusammensetzung des PPC V weicht von den beiden im Gel darüberliegenden Komplexen ab. PPC V bindet gegenüber PPC III und IV deutlich weniger Chl c_2 und Peridinin pro 100 Mole-

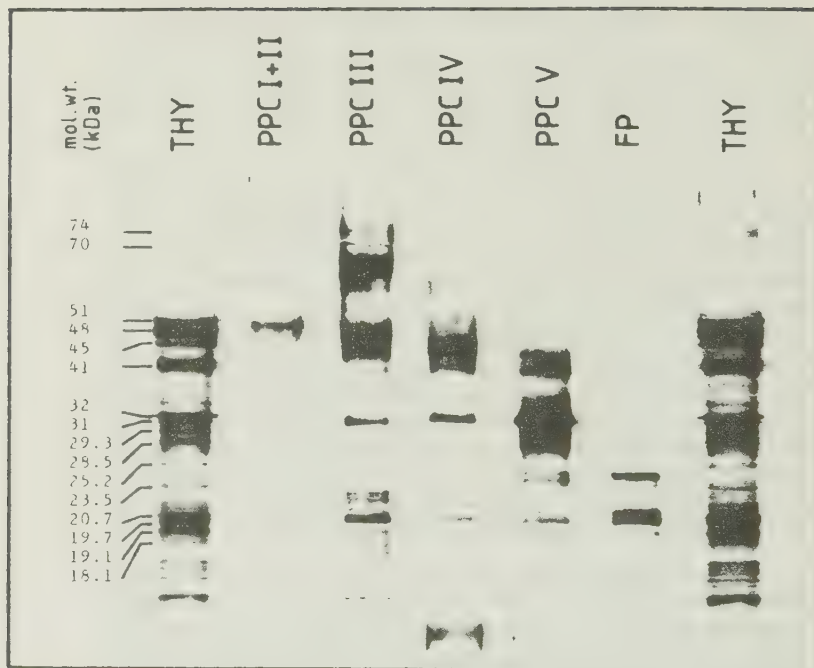


Abb. 8: Polypeptidmuster der Thylakoidmembran und der eluierten Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax*. Die Auftrennungen erfolgten im NEVILLE-Puffersystem nach PICCIONI et al. (1982) bei einem linearen Acrylamidgradienten von 7.5-15%.

küle Chl a, während der Komplex mit β -Carotin angereichert ist (4.41 Moleküle β -Carotin/100 Moleküle Chl a gegenüber 1.99 Molekülen β -Carotin/100 Moleküle Chl a in PPC III) (Tab. 5). Etwa 25-30% des gesamten Chl a sind in dieser Bande lokalisiert. Aus der Polypeptidzusammensetzung wird eine Anreicherung von Proteinen in der 28.5-32 kDa-Region erkennbar (Abb. 8). Proteine von etwa 30 kDa werden als Reaktionszentrumproteine des PS II diskutiert (NANBA & SATOH 1987), so daß aus den Ergebnissen der Pigment- und Polypeptidanalysen eine Lokalisation des PS II vor allem in dieser Bande vermutet werden kann. PPC 5 bindet weiterhin Polypeptide von 41, 45 und 48 kDa, sowie einige kleinere Proteine, insbesondere Polypeptide von 28.5 und 19.1 kDa.

Alle Pigment-Proteine, die entweder mit Chl c_2 und/oder Peridinin angereichert sind (PPC III-V), enthalten ein Protein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, also der Größe des Apoproteins des wasserlöslichen Peridinin-Chl a -Proteins von *Gonyaulax*. Daraus kann gefolgert werden, daß dieses Protein auch integraler Bestandteil der Thylakoidmembranen in *Gonyaulax* ist.

3.2.2 Das wasserlösliche Peridinin-Chl a -Protein

Untersuchungen zur Organisation der Chlorophylle und Carotinoide in Dinoflagellaten haben vor allem zur Charakterisierung des roten, wasserlöslichen PCP geführt, das sehr leicht aus aufgebrochenen Zellen isoliert werden kann (PREZELIN & HAXO 1976, SIEGELMAN et al. 1977).

Das Absorptionsspektrum des PCP in Abbildung 5 zeigt deutliche Chl a -Maxima bei 439 und 670 nm, während Peridinin für die ausgeprägte Absorbanz mit dem Maximum bei 478 nm verantwortlich ist. Diese spektralen Daten befinden sich in Übereinstimmung mit den vielen anderen Arbeiten, die zur Struktur und Funktion des Dinoflagellaten-PCP vorliegen. Die Fluoreszenzexcitations- und -emissionsspektren (Abb. 6) deuten auf einen unbeeinträchtigten Energietransfer vom Peridinin zum Chl a .

Aus dem in Abbildung 2 dargestellten Chromatogramm wird deutlich, daß das PCP ausschließlich die Pigmente Peridinin und Chl a bindet. Aus den quantitativen Pigmentanalysen (Tab. 5) konnte ein Peridinin/Chl a -Verhältnis von 4.41 ± 0.62 (Mittelwert mit Standardabweichung aus 5 Experimenten) ermittelt werden. Die Pigmente binden an Polypeptide von 32 kDa.

3.3 Auftrennung und Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe aus Spinat

Die bereits im Jahre 1978 von MARKWELL et al. (1978) entwickelte Deriphat-PAGE wird wieder zunehmend zur elektrophoretischen Auftrennung von PPC aus höheren Pflanzen, sowie der Charakterisierung spezieller Antennenkomplexe eingesetzt, wenn wenig oder kein Chlorophyll von den Komplexen entfernt werden soll (THORNER et al. 1987).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden SDS-solubilisierete PPC aus Spinat-Thylakoidmembranen auf der Deriphat-PAGE aufgetrennt.

um diese Komplexe unmittelbar mit den aus *Gonyaulax*-Thylakoidmembranen mit der gleichen Methode isolierten PPC zu vergleichen. Zur weiteren Identifizierung der PPC aus Spinat wurden PS I-Partikel (PS I-200-Komplexe) und PS II-Membranen (BBY-Partikel) nach SDS-Solubilisierung mittels Deriphat-PAGE aufgetrennt.

Da die hier charakterisierten PPC aus Spinat nicht eindeutig mit den bisher mittels Deriphat-PAGE aus höheren Pflanzen aufgetrennten Komplexen (MARKWELL et al. 1978, MARKWELL et al. 1979, ESKINS et al. 1983) übereinstimmen, konnte keine der bisher vorgeschlagenen Nomenklaturen der PPC übernommen werden. Unterschiede in den Solubilisierungs- und Fraktionierungsbedingungen führten, auch in diesem eigentlich recht einfachen elektrophoretischen System, zu unterschiedlichen Auftrennungen und Komplexen.

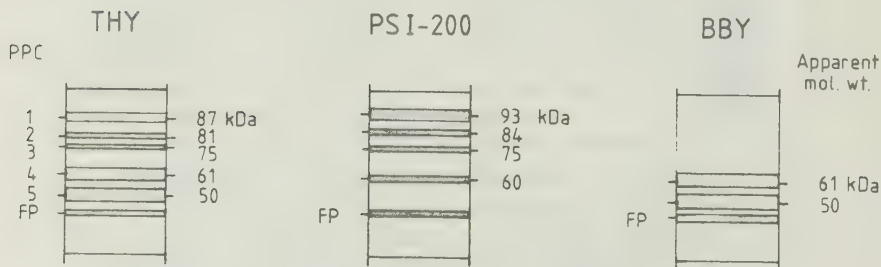


Abb. 9: Schematische Darstellung der Pigment-Protein-Komplexe aus Thylakoidmembranen (THY), PS I-Partikeln (PS I-200) und PS II-Membranen (BBY) von Spinat nach Deriphat-PAGE.

Aus Abbildung 9 ist zu entnehmen, daß sechs Banden aus SDS-solubilisierten Thylakoidmembranen aufgetrennt werden konnten. Fünf der Banden sind Pigment-Protein-Komplexe, die nach steigender elektrophoretischer Mobilität als PPC 1 bis 5 bezeichnet wurden und eine Bande freies Pigment. PPC 2 und 3 wurden gemeinsam eluiert. In Abbildung 10 sind die Absorptionsspektren der PPC dargestellt. Die mit Hilfe der rHPLC ermittelten Pigmentzusammensetzungen der Thylakoidmembranen und der PPC sind in Abbildung 11 dargestellt. In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Pigmentanalysen zusammengefaßt. Die Abbildung 12 gibt die Ergebnisse der Polypeptidanalysen der Thylakoidmembranen und PPC aus Spinat wieder.

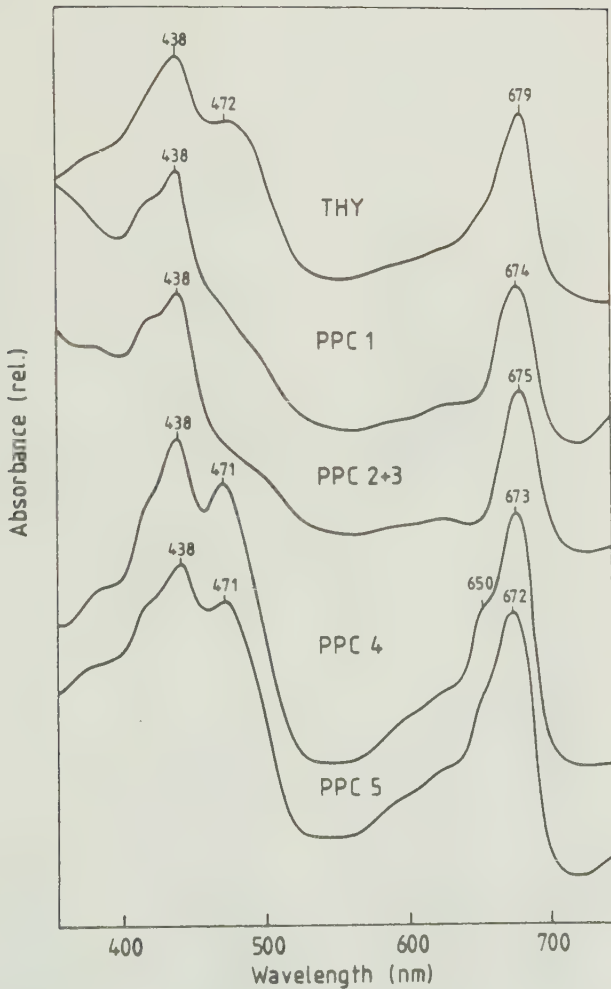


Abb. 10: Absorptionsspektren der Thylakoidmembranen und der Pigment-Protein-Komplexe aus Spinat nach Deriphat-PAGE.

Zunächst werden in diesem Abschnitt die mit dem Photosystem I in Zusammenhang stehenden PPC aus den Thylakoidmembranen von Spinat (PPC 1-3) und dem PS I-200-Komplex besprochen. Danach werden die Komplexe beschrieben, die das Reaktionszentrum des PS II enthalten, die PPC 4 und 5 sowie BBY-Partikel.

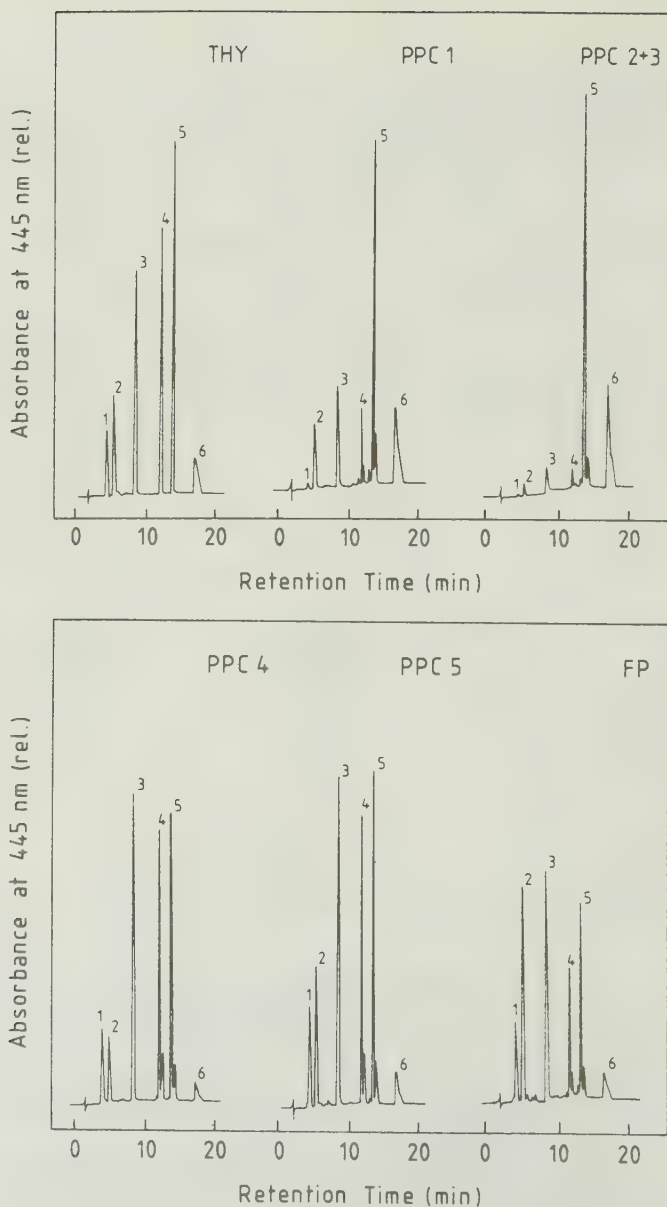


Abb. 11: Chromatogramme der Pigmentextrakte aus Thylakoidmembranen und der Pigment-Protein-Komplexe aus Spinat. Pigmentidentifizierung: 1 Neoxanthin, 2 Violaxanthin, 3 Lutein, 4 Chlorophyll b, 5 Chlorophyll a, 6 β -Carotin. Chromatographische Bedingungen siehe Text.

Tabelle 6: Relative Pigmentzusammensetzung (mol/100 mol Chl a) und molare Pigmentverhältnisse (mol/mol) der Thylakoidmembran und der Pigment-Protein-Komplexe aus Spinat nach Deriphat-PAGE.

Pigment	THY	PPC 1	PPC 2+3	PPC 4	PPC 5	FP
Neoxanthin	7.43 ± 0.56	0.54 ± 0.17	0.42 ± 0.17	6.88 ± 2.35	10.14 ± 2.04	12.38 ± 1.40
Violaxanthin	7.98 ± 1.92	3.86 ± 0.33	1.24 ± 0.29	5.92 ± 1.68	11.13 ± 2.90	29.59 ± 1.80
Lutein	13.39 ± 5.01	5.93 ± 1.13	2.19 ± 0.42	24.25 ± 5.39	24.01 ± 3.28	27.09 ± 0.30
Chlorophyll b	42.41 ± 6.95	8.68 ± 2.45	4.85 ± 1.58	45.78 ± 1.00	42.97 ± 8.10	26.49 ± 1.94
β-Carotin	8.44 ± 0.34	17.12 ± 2.16	17.04 ± 1.43	4.63 ± 0.60	6.17 ± 1.55	10.03 ± 1.56
Verhältnisse						
Chl a/b	2.40 ± 0.42	12.00 ± 3.38	22.28 ± 7.94	2.53 ± 0.60	2.37 ± 0.45	3.78 ± 0.28
Chl a/β-Car	11.86 ± 0.47	5.89 ± 0.74	5.89 ± 0.49	21.84 ± 2.78	17.03 ± 4.96	10.09 ± 1.56
Chl a/Xan	2.59 ± 0.35	9.81 ± 1.55	26.57 ± 4.98	2.81 ± 0.70	2.21 ± 0.13	1.45 ± 0.14
Chl/Xan	3.68 ± 0.35	10.64 ± 1.44	27.82 ± 4.92	3.96 ± 1.08	3.00 ± 0.17	1.83 ± 0.05

Daten (Mittelwerte mit Standardabweichungen) aus 3 Experimenten. Abkürzungen wie in Tabelle 5.

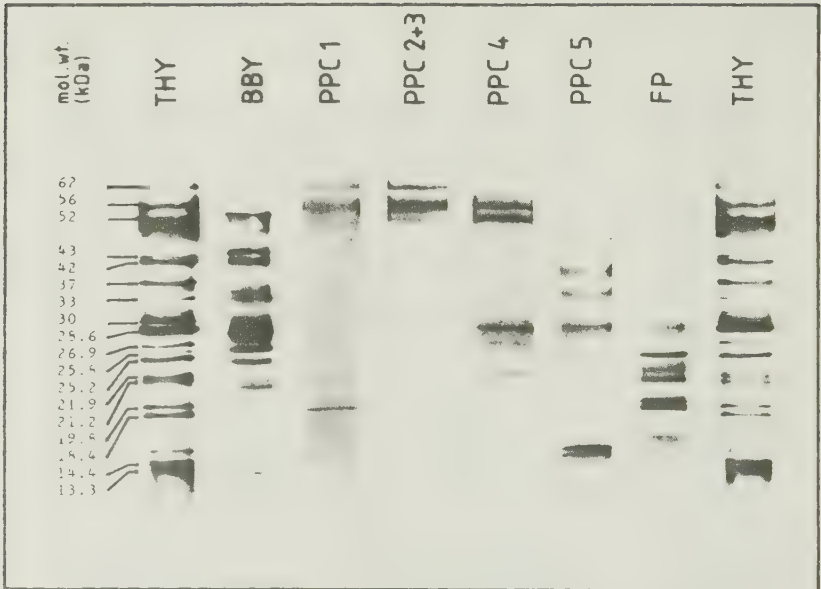


Abb. 12: Polypeptidmuster der Thylakoidmembran (THY) , der PS II-Membranen (BBY) und der eluierten Pigment-Protein-Komplexe (PPC) aus Spinat.

Die Absorptionsmaxima des PPC 1 liegen bei 438 und 674 nm, die der PPC 2+3 bei 438 und 675 nm (Abb. 10). Die aus den Chromatogrammen in Abb. 11 abgeleitete relative Pigmentzusammensetzung ergibt für PPC 1 sowie PPC 2+3 hohe Chl *a/b*-Verhältnisse von 12.00 bzw. 22.28, die damit deutlich höher liegen als in intakten Thylakoidmembranen (Chl *a/b* $\approx$ 2.4). Zusätzlich zu diesem gegenüber den Thylakoidmembranen stark verminderten Chl *b*-Gehalt sind der relative Neoxanthin-, Violaxanthin- und Luteingehalt in den drei PS I-Komplexen gegenüber Thylakoidmembranen stark vermindert, während β -Carotin angereichert ist ($\approx$ 17 Moleküle β -Carotin/100 Moleküle Chl *a* in PPC 1 und PPC 2+3 gegenüber 8.44 Molekülen/100 Moleküle Chl *a* in den Membranen).

Die Pigmentzusammensetzung des PPC 1 (Tab. 6) weist große Ähnlichkeiten mit der des 'nativen' PS I-Komplexes (PS I-200) von MULLET et al. (1980) auf, die der PPC 2+3 ähnelt dem Reaktionszentrumkomplex des PS I, RC I (DAMM 1987). Zur weiteren Identifizierung der PPC 1-3 wurden deshalb PS I-200 Partikel mit SDS

Tabelle 7: Relative Pigmentzusammensetzung (mol/100 mol Chl a) und molare Pigmentverhältnisse (mol/mol) der PPC aus SDS-solubilisierten PS I-200 Komplexen nach Deriphat-PAGE.

Pigment	Banden		
	93 kDa	84,75 kDa	60 kDa
Neoxanthin	-	-	-
Violaxanthin	7.98	2.53	16.93
Lutein	7.46	2.56	19.15
Chlorophyll <u>b</u>	11.96	7.00	33.18
β -Carotin	12.53	13.61	8.95
Verhältnisse			
Chl <u>a/b</u>	8.36	14.29	3.01
Chl <u>a</u> / β -Car	7.98	7.34	11.17
Chl <u>a</u> /Xan	6.48	19.65	2.77
Chl/Xan	7.25	21.02	3.69

Abkürzungen wie in Tabelle 5.

solubilisiert und auf Deriphat-Gele aufgetragen. Dabei ergeben sich aus dieser Auftrennung vier PPC (Abb. 9), wobei drei PPC (93, 84, 75 kDa-Banden) hinsichtlich ihrer Pigmentzusammensetzung (Tab. 7) die gleichen Charakteristika aufweisen wie die PPC 1, 2, 3 nach Deriphat-PAGE von Thylakoidmembranen (Tab. 6). Der relative Chl b- und Xanthophyllgehalt ist gegenüber Thylakoidmembranen vermindert, β -Carotin ist angereichert. Die elektrophoretischen Mobilitäten der entsprechenden Komplexe differieren zwischen den beiden Auftrennungen. Das mag darauf zurückzuführen sein, daß die PS I-200-Partikel bereits im Rahmen ihrer Isolierung vor der SDS-Solubilisierung und nachfolgender Deriphat-PAGE mit dem Detergenz Triton X-100 behandelt wurden. Aus der Tabelle 7 ist weiterhin zu entnehmen, daß die untere Bande (60 kDa) eine Pigmentausrüstung zeigt, wie sie für LHC I beschrieben wurde (DAMM 1987). Diese PS I-spezifische Antenne hat ein Chl a/b-Verhältnis von 3.01 und bindet relativ große Mengen an β -Carotin (8.95 Moleküle/100 Moleküle Chl a).

Damit unterscheidet sie sich von dem Antennenkomplex LHC II, der hauptsächlich mit dem PS II assoziiert ist, ein niedriges Chl *a/b*-Verhältnis von 1.0-1.5 hat und kein β -Carotin bindet (MENGER et al. 1984, KNOETZEL et al. 1988).

PPC 1 bindet die für das Reaktionszentrum des PS I typischen Apoproteine, die hier ein Molekulargewicht von 62 und 56 kDa haben (Abb. 12). In dieser Region findet man auch die Proteine der α - und β -Komponente des CF_1 -Kopplungsfaktors der ATP-Synthase (56, 52 kDa) (MÖLLER 1985, MERCHANT & SELMAN 1985). Zusätzlich tritt eine Bande von 19.8 kDa auf. In PPC 2+3 sind außer den Proteinen des PS I-RZ und des Kopplungsfaktors keine weiteren Polypeptide nachweisbar (Abb. 12).

Die Absorptionsspektren der PPC 4 und 5 zeigen ausgeprägte Chl *b*-Schultern bei 471 und 650 nm (Abb. 10). Das Pigmentmuster ähnelt dem der Thylakoidmembranen, PPC 4 und 5 sind jedoch gegenüber den Membranen angereichert mit Lutein, dem Hauptxanthophyll des Lichtsammelkomplexes (LHC II) (Tab. 6). Die Polypeptidanalyse ergab für PPC 5 Proteine von 42 und 43 kDa, die der PS II-Core Antenne zuzuordnen sind, sowie Polypeptide in der 29-37 kDa-Region (Abb. 12). Dort finden sich u.a. die PS II-Reaktionszentrum Polypeptide D1 und D2 (≈ 30 kDa) (SATO 1988), und die Apoproteine des LHC II (26-30 kDa) (BASSI et al. 1987). In PPC 4 treten die Proteine des Kopplungsfaktors auf, Proteine in der 25-37 kDa-Region sind vorhanden, während die Apoproteine der PS II-Core Antenne nicht oder nur sehr schwach auftreten.

Um eine weitere Zuordnung der PPC 4 und 5 zu Reaktionszentrum- oder Lichtsammelkomplexen zu ermöglichen, wurden PS II Membranen (BBY-Partikel) isoliert. BBY-Partikel wurden nach SDS-Solubilisierung auf Deriphat-Gelen elektrophoretisiert (Abb. 9). Es ergeben sich zwei PPC, die hinsichtlich ihrer Lage im Gel mit PPC 4 und 5 identisch sind, so daß vermutlich in diesen beiden Banden auch nach Solubilisierung von Thylakoidmembranen das PS II mit seinen spezifischen Antennen lokalisiert ist. BBY-Membranen sind gegenüber Thylakoidmembranen angereichert mit Polypeptiden der PS II-Core-Antenne (42, 43 kDa), sowie des PS II-Reaktionszentrums und des LHC II (25.2-37 kDa) (Abb. 12). Die Apoproteine des Reaktionszentrums des PS I fehlen vollständig, ebenso wie das 20-kDa-Polypeptid der PS I-Antenne.

Es treten also keine freien Lichtsammelkomplexe bei der Deriphat-Elektrophorese auf, wie daß in verschiedenen anderen Systemen zur Auftrennung von PPC aus Thylakoidmembranen höherer Pflanzen der Fall ist (ANDERSON et al. 1978, MACHOLD et al. 1979).

3.4 Versuche zur circadianen Rhythmik des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax*

3.4.1 Die Photosynthesekapazität, die Abhängigkeit der Photosynthesekapazität von der Lichtintensität, und der Pigmentgehalt ganzer Zellen

Die Verringerung der Lichtintensität im konstanten Dämmerlicht ($22 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ gegenüber $66 \mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ in der Lichtphase des LDW) der Rhythmusversuche hat zunächst Adaptationen des Photosyntheseapparates zur Folge. Aus dem Vergleich der Abbildungen 13 A und B mit D und E wird ersichtlich, daß der Pigmentgehalt pro Zelle aufgrund der Verringerung der Lichtintensität während der Dämmerlichtbedingungen für Chl *a* und Peridinin zunimmt. Der Chl *a*-Gehalt steigt von $65.9 + 6.5 \text{ nmol Chl } a \times 10^6 \text{ Zellen}^{-1}$ auf $84.5 + 6.8 \text{ nmol Chl } a \times 10^6 \text{ Zellen}^{-1}$, der absolute Peridinin-Gehalt nimmt von $55.7 + 8.2 \text{ nmol Peridinin} \times 10^6 \text{ Zellen}^{-1}$ auf $79.6 + 8.0 \text{ nmol Peridinin} \times 10^6 \text{ Zellen}^{-1}$ zu.

Da sich die relativen Pigmentzusammensetzungen, die in den Abbildungen 13 C u. F zusammengestellt sind, insgesamt nicht wesentlich ändern, spricht das für eine koordinierte Zunahme sowohl der wasserlöslichen Peridinin-Chl *a*-Proteine als auch der membran-intrinsischen Pigment-Protein-Komplexe als Folge der niedrigeren Lichtintensität.

Damit scheint *Gonyaulax* einen anderen Mechanismus der Adaptation zu besitzen als die meisten der bisher untersuchten Dinoflagellaten, in denen eine Komponente als Folge niedrigerer Lichtintensitäten zunimmt, nämlich das wasserlösliche PCP (PREZELIN 1976).

Die Adaptation ist nach 24 h Dämmerlicht abgeschlossen. Um einen Einfluß dieser Veränderungen auf die Untersuchungen zur endogenen Rhythmik auszuschließen, wurde erst nach diesem Zeitraum mit den jeweiligen Messungen begonnen.

Erste Hinweise darauf, daß die photosynthetischen Primärprozesse durch die innere Uhr kontrolliert sind, ergaben sich aus Messungen der Photosynthesekapazität, entweder als Inkorporation von $^{14}\text{CO}_2$ (HASTINGS et al. 1961) oder als Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen (PREZELIN et al. 1977).

In Tabelle 8 sind die Ergebnisse der Messungen zur Photosynthesekapazität ganzer Zellen (Nettophotosyntheseraten), sowie der Messungen zum photosynthetischen Elektronentransport aus

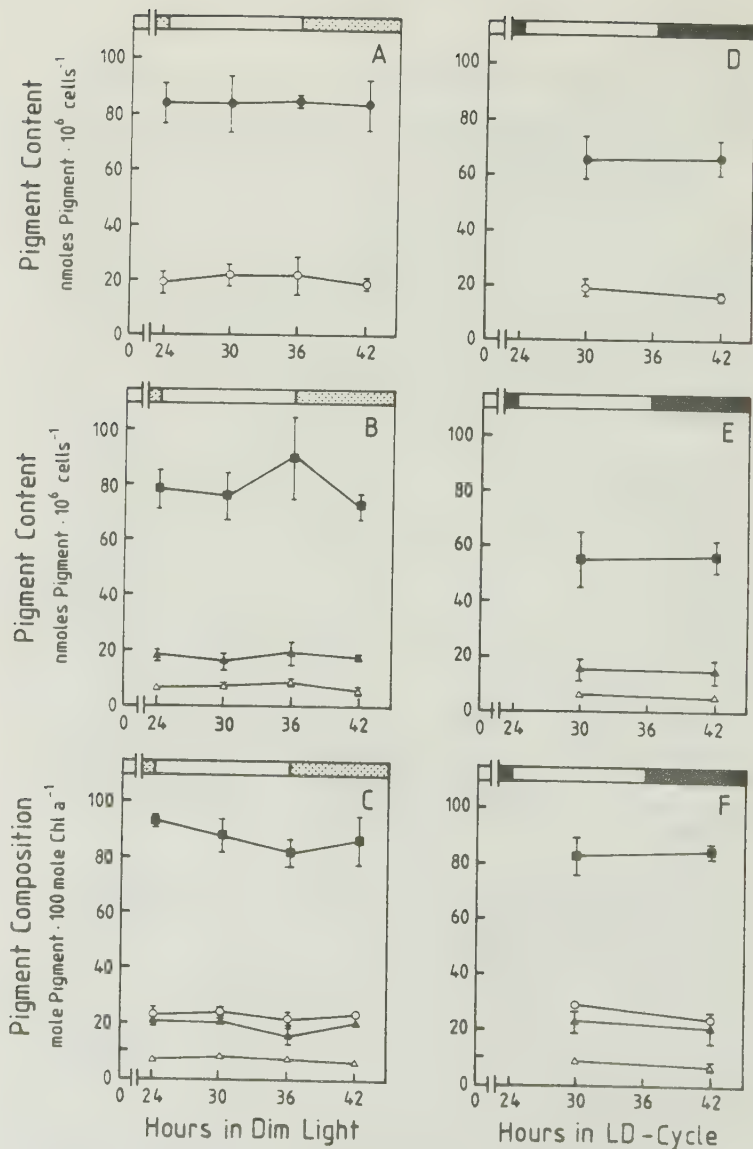


Abb. 13: Pigmentgehalt (nmol Pigment $\times 10^6$ Zellen⁻¹) und relative Pigmentzusammensetzung (mol Pigment $\times 100$ mol Chl a⁻¹) ganzer Zellen von *Gonyaulax* zu verschiedenen Zeitpunkten der Rhythmus (A-C) und LDW-Versuche (D-F). Rhythmusversuche in konstantem Dämmerlicht: Tagphase Nachtphase . LDW-Versuche: Lichtphase Dunkelphase . Pigmentdifferenzierung: Chl a ●, Chl c₂ ○, Peridinin ■, Dinoxanthin △, Diadinoxanthin ▲.

Tabelle 8: Photosynthetische Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen und lichtinduzierter Elektronentransport in Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* zu den Zeitpunkten maximaler (Tag- bzw. Lichtphase) und minimaler (Nacht- bzw. Dunkelphase) Photosynthesekapazität der Rhythmus- bzw. LDW-Versuche.

Experiment	Zellzahl $\cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^3$	Chl a nmol $\cdot \text{Zelle}^{-1} \cdot 10^6$	O_2 -Entwicklung ganzer Zellen	Thylakoidmembranen			
				PS I+II $H_2O \rightarrow MV$	PS II $H_2O \rightarrow DAD/FeCN$ $\mu\text{moles } O_2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1} \cdot h$	PS I DCPIP/ASC $\rightarrow MV$	PS I (Incl. PQ) DHQ $\rightarrow MV$
LDW-Lichtphase							
1	8.7 $\pm$ 0.2	65.69 $\pm$ 7.19	443.72	-122.54 $\pm$ 1.15	67.36 $\pm$ 3.44	-876.42 $\pm$ 64.26	-379.79 $\pm$ 4.59
LDW-Dunkelphase							
1			210.17	-105.50 $\pm$ 2.30	86.29 $\pm$ 7.26	-704.38 $\pm$ 78.04	-
2	8.9 $\pm$ 0.5	66.17 $\pm$ 5.94	198.68	-142.02 $\pm$ 3.44	69.39 $\pm$ 5.73	-866.69 $\pm$ 41.32	-331.10 $\pm$ 64.27
Subjektive Tagphase							
1	9.9 $\pm$ 1.9	91.27 $\pm$ 19.12	328.63 $\pm$ 144.06	-106.72 $\pm$ 4.02	59.31 $\pm$ 9.09	-973.80 $\pm$ 156.07	-324.60 $\pm$ 18.36
2	11.2 $\pm$ 2.5	77.03 $\pm$ 0.55	332.00 $\pm$ 0.97	-115.87 $\pm$ 8.92	85.21 $\pm$ 20.66	-822.05 $\pm$ 120.50	-311.62 $\pm$ 32.14
Subjektive Nachtphase							
1	9.5 $\pm$ 2.4	75.02 $\pm$ 9.25	126.12 $\pm$ 91.73	-104.69 $\pm$ 12.62	102.26 $\pm$ 13.77	-886.16 $\pm$ 123.94	-322.98 $\pm$ 29.83
2	10.5 $\pm$ 2.5	83.34 $\pm$ 2.62	232.92 $\pm$ 48.83	-105.09 $\pm$ 2.87	90.89 $\pm$ 11.48	-923.48 $\pm$ 11.85	-312.70 $\pm$ 56.62

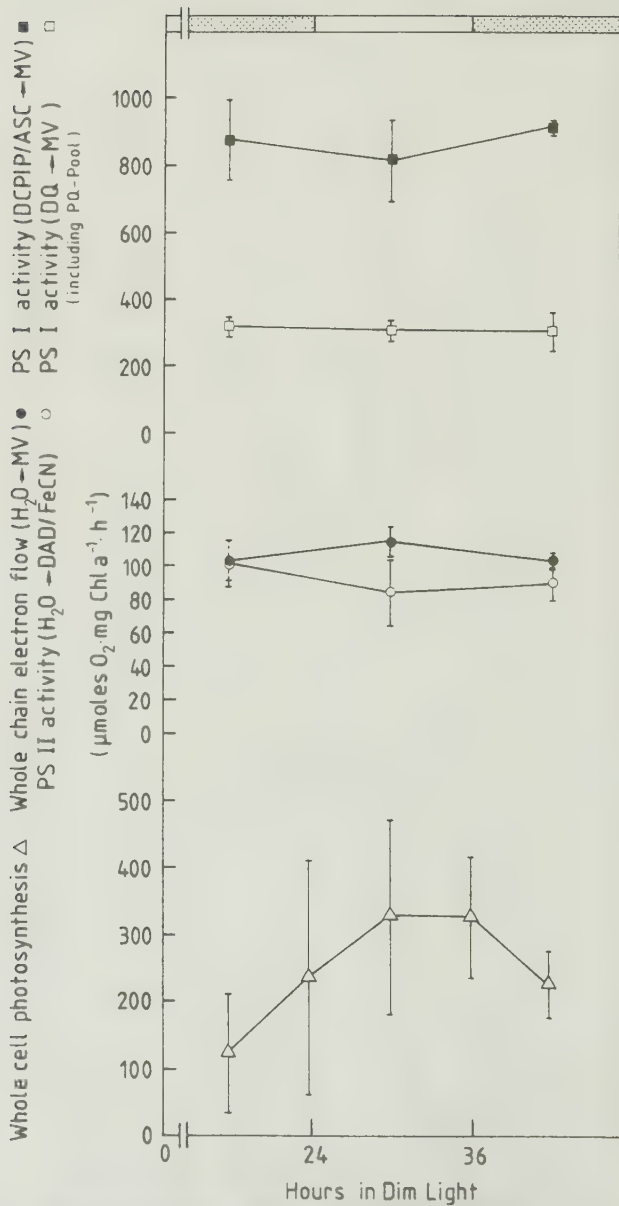


Abb. 14: Photosynthetische Netto-Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen und lichtinduzierter Elektronentransport isolierter Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* zu verschiedenen Zeitpunkten der Tag- und Nachtphasen während der Rhythmusversuche.

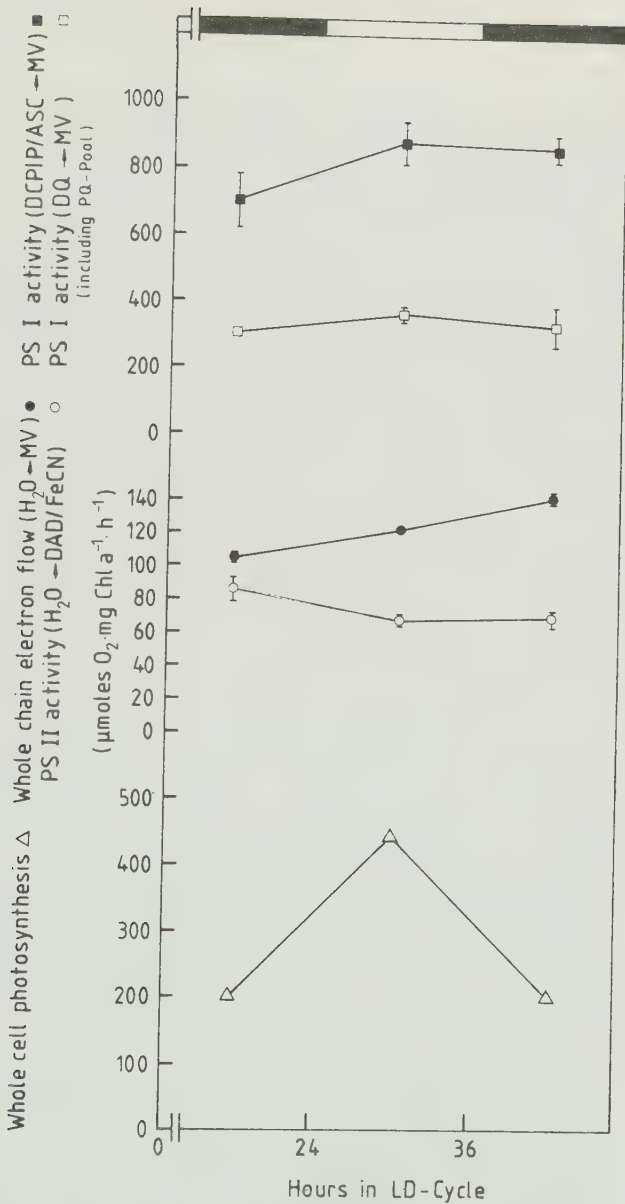


Abb. 15: Photosynthetische Netto-Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen und lichtinduzierter Elektronentransport isolierter Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* zu verschiedenen Zeitpunkten der Licht- und Dunkelphasen während der LDW-Versuche.

den Rhythmus- und LDW-Versuchen zusammengefaßt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind die Daten graphisch in den Abbildungen 14 und 15 dargestellt.

Die Kurven zur Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen während der LDW- und der Rhythmusversuche zeigen einen rhythmischen Verlauf der Nettophotosyntheserate. In den Rhythmusversuchen liegt ein Maximum der O_2 -Entwicklung etwa in der Mitte des Zeitraumes der vorher 'Tag' war (subjektiver Tag), also nach 30 h im Dämmerlicht (CT 30), während das Minimum in der Mitte der subjektiven Nachtphase liegt, d.h. nach 42 h im Dämmerlicht (CT 42) (Abb. 14). Die Versuche, bei denen Zellen im Licht-Dunkel-Wechsel kultiviert wurden, zeigen ein Maximum der Sauerstoffentwicklung in der Mitte der Lichtphase (L 30) sowie ein Minimum in der Mitte der Dunkelphase (D 42) (Abb. 15). In der jeweiligen Tagphase ist die Nettophotosyntheserate etwa doppelt so hoch wie in der Nachtphase. Solche Rhythmen der O_2 -Produktion sind aus Versuchen zur endogenen Rhythmik für viele Algen beschrieben worden, so in *Euglena* sp., *Chlamydomonas* sp. und *Acetabularia* sp. (LONERGAN & SARGENT 1978, EDMUNDS 1984).

Trägt man die Nettophotosyntheseraten gegen die Lichtintensität auf, bei der sie ermittelt wurden, so kann man aus dem Verlauf ihrer Lichtabhängigkeit die Parameter Anfangssteigung (α) und die maximale Photosyntheserate ($P_{\max}$) ablesen. Die Anfangssteigungen der Kurven variieren zu verschiedenen Tages- und Nachtzeiten der Rhythmusversuche. Diese Zusammenhänge sind in Abbildung 16 dargestellt. Zusätzlich steigt die maximale Photosyntheserate, gemessen bei sättigenden Lichtbedingungen, im Verlauf der subjektiven Tagphase (CT 30) auf ein Maximum, und fällt in der subjektiven Nachtphase bei CT 42 auf ein Minimum. Diese Veränderungen lassen sich auch in LDW-Versuchen nachweisen, wie im Insert in Abbildung 16 dargestellt. Nach 30 h im LDW (L 30) zeigen die Zellen eine maximale Photosyntheserate, nach 42 h (D 42) ist $P_{\max}$ nur noch halb so hoch.

Zudem liegen die Lichtintensitäten, bei denen die Lichtsättigung, also $P_{\max}$ erreicht wird, in den Versuchen für die verschiedenen Zeitpunkte eng beieinander.

Aus den bereits besprochenen Abbildungen 13 A-C ist zusätzlich zu entnehmen, daß der Xanthophyll- und der Chlorophyllgehalt der

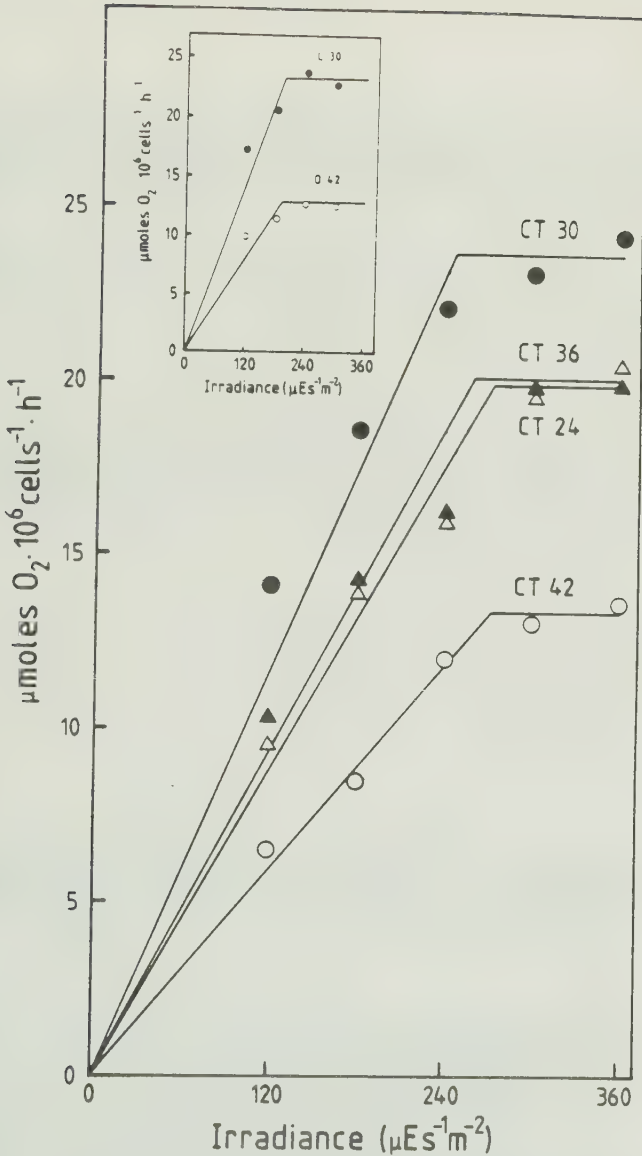


Abb. 16: Photosynthetische Netto-Sauerstoffentwicklung als Funktion der Beleuchtungsstärke zu verschiedenen Zeitpunkten der Tag- und Nachtphasen während der Rhythmusversuche. Die Steigungen der Kurven wurden nach PREZELIN & SWEENEY (1977) durch Berechnung der linearen Regression zwischen 0 und 240 $\mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ermittelt. Insert: Gleiche Darstellung für die Zeitpunkte maximaler (L 30) und minimaler (D 42) Photosynthesekapazität der LDW-Versuche.

Zellen einerseits als auch das Pigmentmuster andererseits über den Zeitraum der Rhythmusversuche hinweg konstant bleiben. Die Abbildungen 13 D-F zeigen, daß dies auch für die LDW-Versuche zutrifft.

Die rhythmischen Veränderungen der Photosynthesekapazität ganzer Zellen, gemessen als O_2 -Produktion, sind also nicht auf Veränderungen des Pigmentgehaltes bzw. Pigmentmusters zurückzuführen.

3.4.2 Der photosynthetische Elektronentransport

Die Arbeiten von SAMUELSSON et al. (1983) und SAMUELSSON & PREZELIN (1985) haben die methodischen Voraussetzungen geschaffen, photosynthetisch aktive Thylakoidmembranen aus Dinoflagellaten zu präparieren, und so erstmals *in vitro*-Elektronentransportraten in diesen Organismen zu ermitteln.

Um einen Hinweis darauf zu bekommen, ob Teilbereiche des photosynthetischen Elektronentransportes durch die innere Uhr beeinflusst sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit eine Reihe von Elektronendonoren und -akzeptoren eingesetzt, die in Abbildung 17 dargestellt sind.

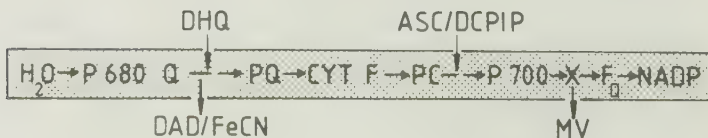


Abb. 17: Vereinfachtes Schema der photosynthetischen Elektronentransportkette. Die Pfeile bezeichnen die Angriffsorte der eingesetzten Elektronendonoren und -akzeptoren. Abkürzungen: P680, Reaktionszentrum des PS II; Q, Primärer Akzeptor des PS II; PQ, Plastochinon (-Pool); Cyt f, Cyt b_6/f -Komplex; PC, Plastocyanin; P700, Reaktionszentrum des PS I; X, Primärer Akzeptor des PS I; F_D , Ferredoxin; NADP, Nicotinamidadeninucleotidphosphat. Elektronendonoren: DHQ, Durohydrochinon; ASC, Ascorbat; DCPIP, 2,6-Dichlorphenolindophenol. Elektronenakzeptoren: DAD, Diaminoduren; FeCN, Kaliumhexacyanoferrat (III); MV, Methylviologen.

Elektronentransport über beide Photosysteme wurde gemessen vom natürlichen Donor H_2O zum Akzeptor Methylviologen. Reduziertes Methylviologen wird durch Sauerstoff wieder oxidiert, dabei entsteht H_2O_2 . Bei Verwendung von NaN_3 kann die gemessene Rate des O_2 -Verbrauchs der Rate der O_2 -Entwicklung bei der Wasserspaltung gleich gesetzt werden, dabei entspricht 1 mol verbrauchtes O_2 4 mol transportierten Elektronen. Die PS II-Aktivität wurde gemessen als Elektronenfluß vom natürlichen Donor H_2O zum Akzeptorpaar DAD/FeCN, PS I-Aktivität als Elektronentransport vom Donorpaar DCPIP/ASC zum Methylviologen. Da es Hinweise auf eine Kontrolle der Rhythmik über die Koordination der beiden Photosysteme gibt (MISCHKIND et al. 1979, LONERGAN & SARGENT 1979), wurde der Plastochinon-Pool, dessen Reoxidation durch den Cytochrom b_6/f -Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Elektronentransportes zwischen PS II und PS I ist (WITT 1971, BARBER 1983), in einen zweiten Ansatz zur PS I-Aktivitätsmessung mit einbezogen (DHQ $\rightarrow$ MV). Bei den Messungen zur PS I-Aktivität handelt es sich also um HILL-Reaktionen ohne Wasserspaltung (mit NaN_3 und MV), pro 1 Molekül verbrauchtem O_2 werden 2 Elektronen transportiert.

Die Resultate dieser Untersuchungen sind in Tabelle 8 und den Abbildungen 14 und 15 zusammengestellt. Der Elektronenfluß wird jeweils ausgedrückt als O_2 -Entwicklung bzw. -Verbrauch pro Chl a, da sich der Pigmentgehalt der Zellen - wie in Abschnitt 3.4.1 dargestellt - während der LDW- und Rhythmusversuche nicht ändert.

SAMUELSSON et al. (1983) schließen aus den Ergebnissen ihrer Elektronentransportmessungen an *Gonyaulax*-Thylakoidmembranen auf eine Rhythmik der PS II-Aktivität (gemessen als Elektronentransport von H_2O nach DAD/FeCN), wobei die Veränderungen des Elektronentransportes im PS II denen des Gesamtelektronenflusses über beide Photosysteme entsprechen.

Meine Untersuchungen lassen jedoch für den lichtinduzierten Elektronentransport über beide Photosysteme ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ MV), über PS I (DCPIP/ASC $\rightarrow$ MV), über PS II ($\text{H}_2\text{O} \rightarrow$ DAD/FeCN) sowie über PS I mit Einbeziehung des Plastochinon-Pools sowohl in den Rhythmus- als auch in den LDW-Versuchen keine rhythmischen Veränderungen erkennen (Abb. 14 und 15).

Die Elektronentransportraten der *in vitro* PS I-Aktivität von

DCPIP/ASC zum MV entsprechen, bezogen auf den Elektronenfluß, den Licht- bzw. Tagphasenwerten der *in vivo* Photosynthesekapazität ganzer Zellen (Tab. 8). In einigen Fällen sind diese Raten im Vergleich zur *in vivo* O₂-Entwicklung sogar leicht erhöht.

Die Ergebnisse der Messungen zum *in vitro*-Gesamtelektronentransport und zur *in vitro* PS II-Aktivität sind im Vergleich zur *in vivo* O₂-Entwicklung etwa um den Faktor 3-6 (Tagphase), bzw. 1.5-2.5 (Nachtphase), niedriger (Tab. 8). Entkoppler haben dabei keinen stimulierenden Einfluß mehr auf die Photosyntheserate isolierter Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax*, so daß die Präparation bereits zu einer Entkopplung führt (SAMUELSSON & PREZELIN 1985).

3.4.3 Die membran-intrinsischen und wasserlöslichen Pigment-Protein-Komplexe

Die in den Abschnitten 3.1 und 3.2.1 beschriebenen Methoden zur Auftrennung und Charakterisierung der membran-intrinsischen PPC aus *Gonyaulax* wurden eingesetzt, um Hinweise auf eventuelle Veränderungen in der Organisation der Pigment-Proteine zu erhalten.

Für die Untersuchung der Pigment-Protein-Komplexe zu verschiedenen Zeitpunkten der Rhythmus- und LDW-Versuche wurden jeweils die Zeiten höchster Photosynthesekapazität in der Tagphase (CT 30 bzw. L 30) und niedrigster Kapazität in der Nachtphase (CT 42, D 42) ausgewählt. Die Thylakoidmembranen wurden sofort nach ihrer Präparation solubilisiert und elektrophoretisiert.

Für jeden der untersuchten Zeitpunkte konnten fünf PPC, wie sie in Abbildung 4 dargestellt sind, aufgetrennt werden. In einigen Auftrennungen war PPC II nur schwach ausgeprägt. Es konnten keine Veränderungen des PPC-Bandenmusters oder der elektrophoretischen Mobilität einzelner Banden beobachtet werden. Die Banden PPC I und II wurden gemeinsam eluiert, da sie, wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, identische Pigmentmuster besitzen. PPC III und IV wurden ebenfalls gemeinsam aus dem Gel eluiert, da sie in der Regel sehr eng beieinander liegen. Daneben wurden Pigmentextrakte von PPC V, FP und Thylakoidmembranen analysiert. Die Ergebnisse aus den Pigmentanalysen der PPC aus den Rhythmus- und LDW-Versuchen sind in den Tabelle 9 und 10 zusammengefaßt.

Tabelle 9: Relative Pigmentzusammensetzung (mol/100 mol Chl a) und molare Pigmentverhältnisse (mol/mol) der Thylakoidmembran und der Pigment-Protein-Komplexe aus Gonyaulax zu den Zeitpunkten maximaler (CT 30) und minimaler (CT 42) Photosynthesekapazität der Rhythmusversuche.

Pigment	CT 30									
	THY		PPC I+II		PPC III+IV		PPC V		FP	
Chlorophyll <u>c</u> ₂	22.11 ± 2.11		6.37 ± 3.09		43.53 ± 2.35		12.38 ± 1.84		29.15 ± 10.62	
Peridinin	67.06 ± 3.76		23.91 ± 9.51		151.02 ± 20.77		53.58 ± 3.41		169.91 ± 50.57	
Dinoxanthin	8.10 ± 0.24		12.74 ± 0.57		14.27 ± 0.17		5.46 ± 0.81		8.88 ± 2.74	
Diadinoxanthin	19.20 ± 4.53		24.04 ± 2.41		33.09 ± 1.74		15.05 ± 2.75		35.15 ± 6.51	
Diatoxanthin	0.33 ± 0.03		0.46 ± 0.15		0.77 ± 0.65		0.17 ± 0.05		-	
β-Carotin	3.60 ± 1.46		6.00 ± 1.77		2.61 ± 0.35		5.20 ± 1.67		-	
Xan/Chl <u>a</u>	0.95		0.61		1.99		0.74		2.14	

Pigment	CT 42									
	THY		PPC I+II		PPC III+IV		PPC V		FP	
Chlorophyll <u>c</u> ₂	21.44 ± 2.45		5.47 ± 1.20		97.65 ± 22.54		40.19 ± 11.60		23.22 ± 22.95	
Peridinin	63.92 ± 6.73		15.33 ± 4.49		250.68 ± 2.80		108.03 ± 24.55		155.17 ± 56.08	
Dinoxanthin	7.28 ± 0.54		19.44 ± 2.91		19.25 ± 5.25		11.92 ± 3.32		5.92 ± 1.82	
Diadinoxanthin	16.55 ± 1.39		34.99 ± 9.04		56.85 ± 14.26		35.88 ± 21.14		26.71 ± 9.19	
Diatoxanthin	0.32 ± 0.01		0.82 ± 0.20		0.97 ± 0.52		0.87 ± 0.02		0.89 ± 0.18	
β-Carotin	4.49 ± 0.88		6.11 ± 2.08		1.63 ± 0.59		4.72 ± 1.86		-	
Xan/Chl <u>a</u>	0.88		0.69		3.28		1.57		1.89	

Zusätzlich wurde die Verteilung von Peridinin und Chl a auf Thylakoidmembranen und PCP für die verschiedenen Zeitpunkte untersucht (Tabelle 11).

Die Pigmentzusammensetzung der PPC aus der Lichtphase (L 30) des LDW-Versuches (Tab. 10) entspricht erwartungsgemäß den schon in Abschnitt 3.2.1 in der Tabelle 5 zusammengestellten Daten. Für die subjektive Tagphase (CT 30) der Rhythmusversuche ergeben sich sehr ähnliche Resultate, was aus den Xan/Chl a-Verhältnissen in den Tabellen 9 und 10 deutlich wird. Vergleicht man die Ergebnisse der Pigmentanalysen der subjektiven Tagphase der Rhythmusversuche mit denen der Nachtphase, so ist die Chl- und Carotinoidzusammensetzung der Thylakoidmembranen und der freien Pigmente als konstant anzusehen (Tab. 9). Die PS I-enthaltenden Komplexe PPC I+II weisen eine über den Versuchszeitraum nahezu gleichbleibende Pigmentzusammensetzung auf, ihre Xantho-

Tabelle 10: Relative Pigmentzusammensetzung (mol/100 mol Chl a) und molare Pigmentverhältnisse (mol/mol) der Thylakoidmembran und der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* zu den Zeitpunkten maximaler (L 30) und minimaler (D 42) Photosynthesekapazität der LDW-Versuche.

	L 30							
Pigment	THY	PPC I+II		PPC III+IV		PPC V		FP
Chlorophyll <u>c</u> ₂	19.87	2.45 ±	0.37	23.30 ±	4.83	10.71 ±	0.85	6.69 ± 1.08
Peridinin	76.21	13.11 ±	6.75	156.79 ±	21.16	85.70 ±	14.09	103.37 ± 15.06
Dinoxanthin	7.00	8.95 ±	1.70	10.64 ±	1.07	5.54 ±	1.01	3.19 ± 0.40
Diadinoxanthin	24.68	20.41 ±	3.60	35.30 ±	2.03	27.08 ±	2.61	26.87 ± 2.90
Diatoxanthin	0.44	0.50 ±	0.13	0.86 ±	0.60	0.51 ±	0.10	0.63 ± 0.06
β-Carotin	0.85	11.15 ±	2.39	2.57 ±	1.29	1.59 ±	0.37	-
Xan/Chl <u>a</u>	1.08	0.43		2.05		1.19		1.34

	D 42							
	THY	PPC I+II		PPC III+IV		PPC V		FP
Chlorophyll <u>c</u> ₂	25.09	6.05 ±	1.32	42.73 ±	7.15	12.11 ±	0.26	9.72 ± 5.84
Peridinin	79.41	28.07 ±	7.59	255.82 ±	44.80	75.08 ±	8.53	110.85 ± 8.46
Dinoxanthin	6.33	14.22 ±	0.86	15.69 ±	3.04	8.69 ±	3.99	3.80 ± 0.65
Diadinoxanthin	22.48	37.42 ±	3.20	47.53 ±	14.96	19.67 ±	1.01	25.22 ± 4.75
Diatoxanthin	0.19	0.34 ±	0.06	1.59 ±	0.28	-		-
β-Carotin	0.59	8.43 ±	3.12	0.73 ±	0.08	4.89 ±	4.26	-
Xan/Chl <u>a</u>	1.08	0.80		3.21		1.03		1.39

phyllausstattung, die auf eine spezifische PS I-Antenne zurückgeführt werden kann, verändert sich kaum, so daß auf eine einheitliche Organisation dieses PS I-Suprakomplexes während der Tag- und Nachtphase geschlossen werden kann. Veränderungen der Pigmentzusammensetzung ergeben sich für PPC III+IV und PPC V. Das Xan/Chl a-Verhältnis hat sich in der Nachtphase gegenüber der Tagphase deutlich erhöht (Tab. 9).

Ein Vergleich der Pigmentzusammensetzung der Thylakoidmembranen, der PPC und der freien Pigmente der Zeitpunkte maximaler und minimaler Photosynthesekapazität der LDW-Versuche macht ebenfalls deutlich, daß sich das Pigmentmuster der Membranen und der FP nicht ändert (Tab. 10). Für den PS II-enthaltenden Komplex PPC V können ähnliche Aussagen gemacht werden. Demgegenüber erkennt man Veränderungen der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung bei den PPC I+II und PPC III+IV, vor allem im Hinblick auf ihre Xan/Chl a-Verhältnisse. Für die PPC I+II hat sich dieses Verhältnis in der Dunkelpphase gegenüber der Lichtphase nahezu verdoppelt, für die PPC III+IV steigt es deutlich (Tab. 10).

Tabelle 11: Prozentuale Verteilung der Pigmente Peridinin und Chl a zwischen der Thylakoidmembranfraktion (THY) und den wasserlöslichen Peridinin-Chl a-Proteinen (PCP) für die Zeitpunkte maximaler und minimaler Photosynthesekapazität der Rhythmus- und LDW-Versuche.

Rhythmusversuch			LDW-Versuch		
	THY	PCP		THY	PCP
Tagphase CT 30			Lichtphase L 30		
Peridinin	69%	31%	Peridinin	74%	26%
Chl <u>a</u>	92%	8%	Chl <u>a</u>	92%	8%
Nachtphase CT 42			Dunkelphase D 42		
Peridinin	71%	29%	Peridinin	81%	19%
Chl <u>a</u>	94%	6%	Chl <u>a</u>	95%	5%

In die Kalkulation der membrangebundenen Pigmente wurden die Pigmente aus den Zellbruchstücken, die während der Thylakoidmembranpräparation abzentrifugiert werden, mit einbezogen.

Da in den Rhythmus- und in den LDW-Versuchen sowohl das Pigmentmuster der Thylakoidmembranen als auch das Muster und der Anteil der freien Pigmente konstant bleiben, können die Veränderungen der Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung der genannten PPC vermutlich auf unterschiedliche Aggregationsformen zurückgeführt werden.

Die Veränderungen der Xan/Chl a-Verhältnisse in den membran-intrinsischen PPC können nicht auf einen, zu verschiedenen Tag- und Nachtphasen unterschiedlichen Grad einer Inkorporation von Peridinin-Chl a-Proteinen in die Membran zurückgeführt werden. Die Untersuchung der Verteilung der Pigmente Chl a und Peridinin zwischen der Thylakoidmembran und dem wasserlöslichen PCP (Tab. 11) ergibt einen sich nur unwesentlich verändernden Anteil der membrangebundenen und PCP-gebundenen Pigmente über die untersuchten Zeiträume hinweg.

Bei den Rhythmus- und LDW-Versuchen ändert sich in gleicher Weise das Pigmentmuster nur für die PPC III+IV. Tagsüber scheinen die PS II-Komplexe mit geringem Xan/Chl a-Verhältnis, PPC V, vermehrt mit den PPC III+IV assoziiert, so daß das Xan/Chl a-Verhältnis in PPC III+IV erniedrigt ist. Die PS II-Komplexe mit relativ kleinem Absorptionsquerschnitt (PPC V) sind in der Tagphase in größte-

rem Umfang Bestandteil der PPC III-Bande, und aggregieren dort zu einem komplexeren PS II-Protein. Nachts ist PPC V demgegenüber in geringerem Umfang an PPC III+IV gekoppelt, deren Xan/Chl *a*-Verhältnis ist entsprechend erhöht.

Diese hier postulierten Hypothesen sollen durch eine Analyse der PS II-Struktur über Fluoreszenzinduktionsmessungen überprüft werden.

3.4.4 Fluoreszenzinduktionsmessungen zur Analyse der PS II-Struktur

Der Anstieg der Chlorophyllfluoreszenz nach Belichtung dunkel-adaptierter, mit DCMU-behandelter Chloroplasten höherer Pflanzen zeigt einen biphasischen Verlauf: einer schnellen, nichtexponentiellen α -Phase folgt eine langsamere exponentielle β -Phase. Diese beiden Phasen werden zwei verschiedenen PS II-Formen zugeschrieben: dem PS II $_{\alpha}$ und dem PS II $_{\beta}$ (MELIS & HOMANN 1975, 1976). Diese - aus Untersuchungen an höheren Pflanzen hervorgegangenen PS II-Typen - sollen sich u.a. in ihrer Antennengröße (MELIS & DUYSSENS 1979) sowie dem Redoxpotential ihres primären Akzeptors Q unterscheiden (MELIS 1978). Bisher liegen jedoch keine Untersuchungen zur PS II-Heterogenität an Dinoflagellaten vor.

Die Ergebnisse einer Analyse der Fluoreszenzinduktionskinetik sind von der Wellenlänge des Anregungslichtes abhängig (PERCIVAL et al. 1984). So fand man bei höheren Pflanzen, daß bei bevorzugter Anregung von Pigmenten des LHC II (450 nm) der meßbare Anteil der α -Zentren höher war als bei Anregung von Chl *a*-Molekülen in unmittelbarer Nähe der PS II-Reaktionszentren (550 nm). Das führte zu dem Schluß, daß der bestimmende Faktor bei der Ausbildung der PS II $_{\alpha}$ -Charakteristik in Fluoreszenzinduktionskurven eine Assoziation des LHC II an das PS II ist, während PS II $_{\beta}$ durch Abkopplung des LHC II vom PS II entsteht (PERCIVAL et al. 1984). Um zu klären, ob auch in *Gonyaulax* Lichtsammelkomplexe zur Ausbildung einer PS II $_{\alpha}$ -Charakteristik beitragen, erfolgte die Anregung einerseits mit blaugrünem Licht (Filter BG 39), um bevorzugt Peridinin-haltige Antennenkomplexe anzuregen, andererseits mit grünem Licht (Filter SFK 11).

Die in den Abbildungen 18 A und 19 A zusammengefaßten Fluoreszenzinduktionskurven zeigen, zusammen mit ihren Analysen 1. Ordnung (Abbildungen 18 B und 19 B), daß die Fluoreszenzinduktion biphasisch ist, also auch in *Gonyaulax* eine PS II-Heterogenität vermutet werden kann.

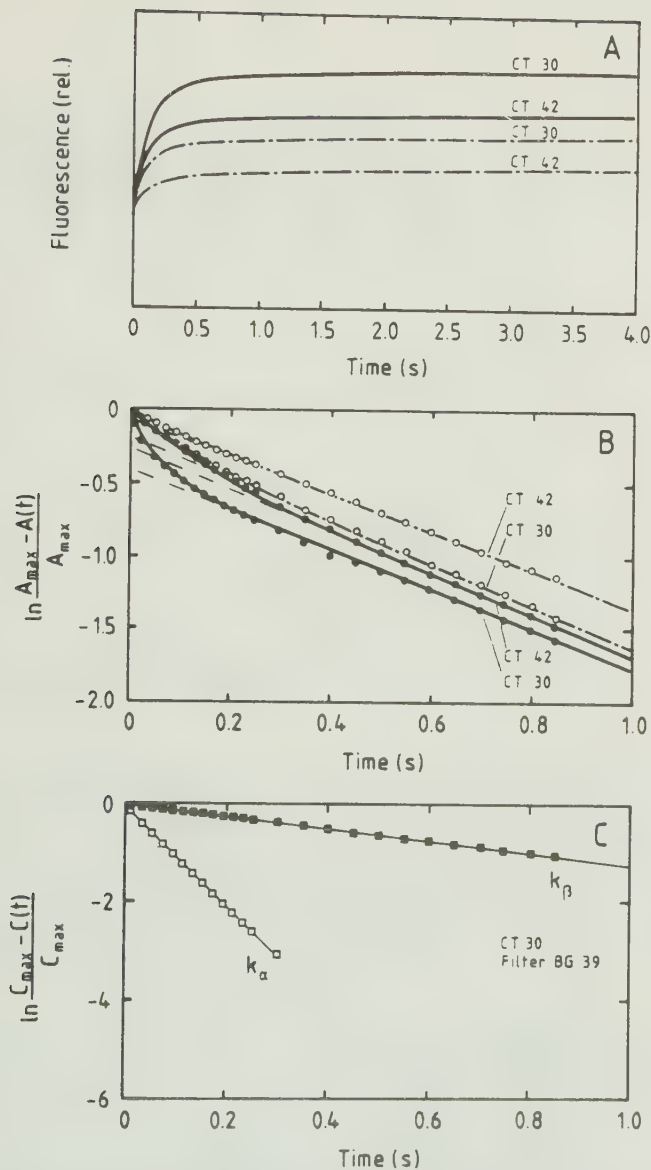


Abb. 18: A: Fluoreszenzinduktionskurven von *Gonyaulax* in der Tag-phase (CT 30) und Nachtphase (CT 42). Das Anregungslicht wurde mit einem Blaugrünfilter (BG 39) (durchgezogene Linie) oder einem Grünfilter (SFK 11) (unterbrochene Linie) gefiltert.

B: Analyse 1. Ordnung der Flächenzunahme oberhalb der Fluoreszenzinduktionskurven aus (A). Der Schnittpunkt der Verlängerung der Geraden mit der Ordinate ergibt den Logarithmus des prozentualen Anteils der β -Zentren.

C: Analyse 1. Ordnung der Daten vom Zeitpunkt CT 30 (Filter BG 39) für die Kinetiken des schnellen (α) und des langsamen Teils (β) der Fluoreszenzinduktionskurve.

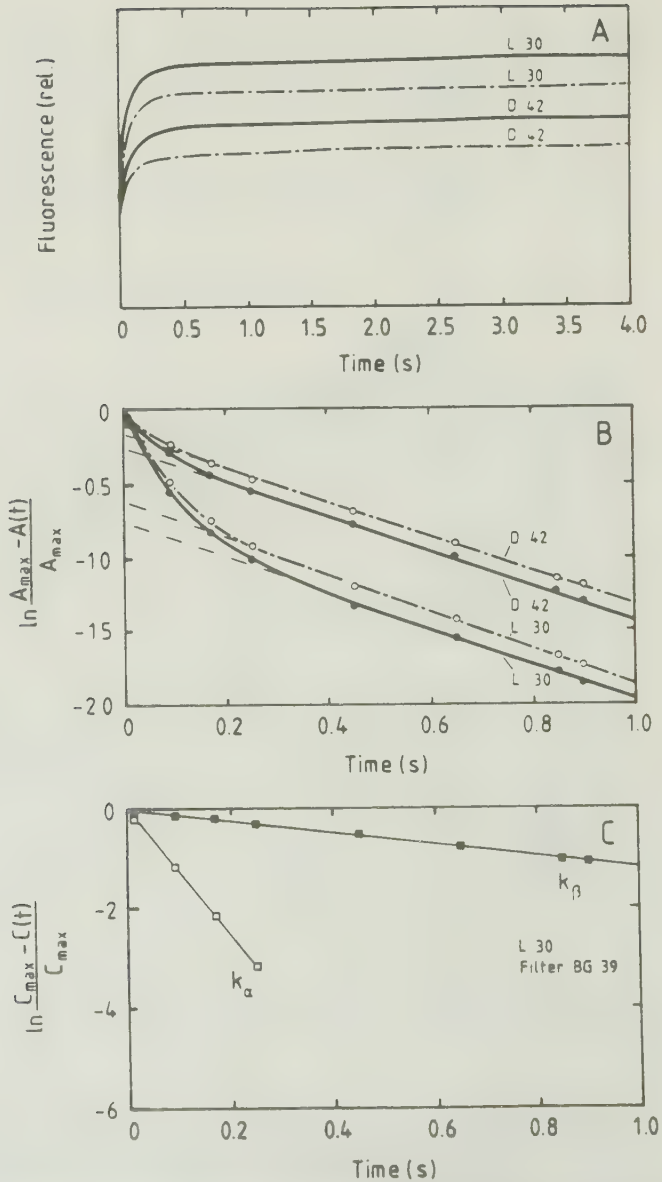


Abb. 19: A: Fluoreszenzinduktionskurven von *Gonyaulax* in der Licht- (L 30) und Dunkelphase (D 42) während der LDW-Versuche. Das Anregungslicht wurde mit einem Blaugrünfilter (BG 39) (durchgezogene Linie) oder einem Grünfilter (SPK 11) gefiltert.
B und C wie in Abb. 18; Daten für C: L 30 (Filter BG 39).

Tabelle 12: Anteile und Kinetiken des langsamen und des schnellen Teils der Fluoreszenzinduktionskurve bei DCMU-Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten der Tag- und Nachtphasen während der Rhythmusversuche.

	Stunden in Dämmerlicht			
	CT 24	CT 30	CT 36	CT 42
Filter SFK 11				
$\beta_{\max}$ (%)	80.34 $\pm$ 3.72	78.14 $\pm$ 2.67	85.87 $\pm$ 2.09	91.96 $\pm$ 3.03
$\alpha_{\max}$ (%)	19.66 $\pm$ 3.72	21.86 $\pm$ 2.67	14.13 $\pm$ 2.09	8.04 $\pm$ 3.03
k_{α} (s ⁻¹)	9.42 $\pm$ 0.54	9.65 $\pm$ 1.04	10.15 $\pm$ 0.57	8.37 $\pm$ 0.13
k_{β} (s ⁻¹)	1.50 $\pm$ 0.13	1.51 $\pm$ 0.08	1.41 $\pm$ 0.11	1.33 $\pm$ 0.06
k_{α}/k_{β}	6.32 $\pm$ 0.67	6.43 $\pm$ 1.06	7.05 $\pm$ 0.32	6.28 $\pm$ 0.19
Filter BG 39				
$\beta_{\max}$ (%)	68.39 $\pm$ 4.71	63.98 $\pm$ 2.01	71.58 $\pm$ 3.73	77.12 $\pm$ 2.47
$\alpha_{\max}$ (%)	31.61 $\pm$ 4.71	36.02 $\pm$ 2.01	28.42 $\pm$ 3.73	22.88 $\pm$ 2.47
k_{α} (s ⁻¹)	10.74 $\pm$ 0.58	10.68 $\pm$ 1.31	10.56 $\pm$ 0.64	10.24 $\pm$ 0.91
k_{β} (s ⁻¹)	1.41 $\pm$ 0.13	1.51 $\pm$ 0.24	1.39 $\pm$ 0.06	1.42 $\pm$ 0.75
k_{α}/k_{β}	7.66 $\pm$ 0.66	7.17 $\pm$ 1.07	7.63 $\pm$ 0.63	7.22 $\pm$ 0.90
Mittelwerte und Standardabweichungen aus 2 Experimenten mit jeweils 3-4 Messungen pro Zeitpunkt und Filtertyp.				

Dennoch gibt es im Vergleich zu höheren Pflanzen Unterschiede. Die schnelle Phase der Fluoreszenz zeigt einen nahezu exponentiellen Charakter, und steigt von einem relativ hohen Anfangsniveau. Ein sigmoider Verlauf der schnellen Komponente, wie für grüne Pflanzen beschreiben, läßt sich nicht erkennen, so daß die Induktionskurve eher als die Summe zweier exponentieller Komponenten beschrieben werden kann. In Analogie zur biphasischen Kinetik in Chloroplasten höherer Pflanzen wurden die beiden Komponenten mit α (schnelle Phase) und β (langsame Phase) bezeichnet.

Die Abbildungen 18 C und 19 C stellen die Kinetiken der α - und β -Zentren getrennt dar. Der exponentielle Charakter der α -Komponente wird durch die Linearität der logarithmischen Auftragung der α -Komponente deutlich. Ein nicht exponentieller Charakter der PS II _{α} -Photochemie wird bei höheren Pflanzen einer Kooperativität der PS II-Einheiten zugeordnet. So wurde in der Regel ein permanenter Anstieg der Ladungstrennungsgeschwindigkeit der PS II _{α} -Partikel mit fortschreitender Zeit gefunden, wobei k_{α} um das 4-5fache zunimmt (MELIS & ANDERSON 1983). Die Ursache dafür liegt also in einer Organisation der α -Zentren zu Aggregaten, in denen jedes RZ aus den am 'Cluster' beteiligten Lichtsammelkomplexen Anregungsenergie erhalten kann.

Tabelle 13: Anteile und Kinetiken des langsamen und des schnellen Teils der Fluoreszenzinduktionskurve bei DCMU-Hemmung zu verschiedenen Zeitpunkten der Licht- und Dunkelphasen während der LDW-Versuche.

	Stunden im Licht-Dunkel Wechsel			
	L 24	L 30	L 36	D 42
Filter SFK 11				
$\beta_{\max}$ (%)	74.50 $\pm$ 3.10	56.73 $\pm$ 2.43	72.65 $\pm$ 3.80	79.87 $\pm$ 2.80
$\alpha_{\max}$ (%)	25.50 $\pm$ 3.10	43.27 $\pm$ 2.43	27.35 $\pm$ 3.80	20.13 $\pm$ 2.80
k_{α} (s ⁻¹)	11.63 $\pm$ 1.26	13.55 $\pm$ 0.91	11.10 $\pm$ 2.62	8.57 $\pm$ 1.47
k_{β} (s ⁻¹)	1.22 $\pm$ 0.24	1.29 $\pm$ 0.02	1.35 $\pm$ 0.34	1.22 $\pm$ 0.16
k_{α}/k_{β}	9.85 $\pm$ 2.95	10.49 $\pm$ 0.79	9.01 $\pm$ 4.32	7.20 $\pm$ 2.27
Filter BG 39				
$\beta_{\max}$ (%)	80.43 $\pm$ 1.06	49.81 $\pm$ 3.62	63.81 $\pm$ 1.84	69.88 $\pm$ 3.74
$\alpha_{\max}$ (%)	19.57 $\pm$ 1.06	50.19 $\pm$ 3.62	36.19 $\pm$ 1.84	30.19 $\pm$ 3.74
k_{α} (s ⁻¹)	-	12.84 $\pm$ 1.12	13.23 $\pm$ 1.40	11.31 $\pm$ 0.68
k_{β} (s ⁻¹)	-	1.20 $\pm$ 0.16	1.45 $\pm$ 0.43	1.30 $\pm$ 0.19
k_{α}/k_{β}	-	10.74 $\pm$ 0.89	9.80 $\pm$ 3.62	8.85 $\pm$ 1.29
Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 2 Experimenten mit jeweils 3-4 Messungen pro Zeitpunkt und Filtertyp.				

Bei Anregung mit blaugrünem Licht (Filter BG 39) (Abb. 18, 19, durchgezogene Linien) ist die schnelle Phase der Induktionskinetik immer stärker ausgeprägt als bei Anregung mit grünem Licht (Filter SFK 11) (Abb. 18 und 19, unterbrochene Linien). Da die braune Farbe von *Gonyaulax* letztendlich eine Folge der Absorption von blaugrünem Licht durch das Carotinoid Peridinin ist, gibt die Erhöhung der α -Phase bei Anregung mit blaugrünem Licht einen Hinweis darauf, daß genauso wie in höheren Pflanzen und Grünalgen Lichtsammelkomplexe für eine ausgeprägtere PS II $_{\alpha}$ -Charakteristik notwendig sind.

Die relativen Anteile von PS II $_{\alpha}$ und PS II $_{\beta}$ können durch den Parameter $\beta_{\max}$ quantifiziert werden, eine Abnahme von $\beta_{\max}$ bedeutet einen zunehmenden Anteil von PS II $_{\alpha}$ an der Induktionskurve. Die ermittelten Werte des prozentualen Anteils der PS II $_{\beta}$ -Zentren sind in den Tabellen 12 und 13 und zur Veranschaulichung in den Abbildungen 20 und 21 zusammengestellt.

Der Einfluß der spektralen Zusammensetzung des Anregungslichtes auf den Anteil der meßbaren β -Zentren drückt sich in einer etwa 5-15%igen Zunahme der α -Zentren bei Anregung mit blaugrünem Licht gegenüber der Anregung mit grünem Licht aus.

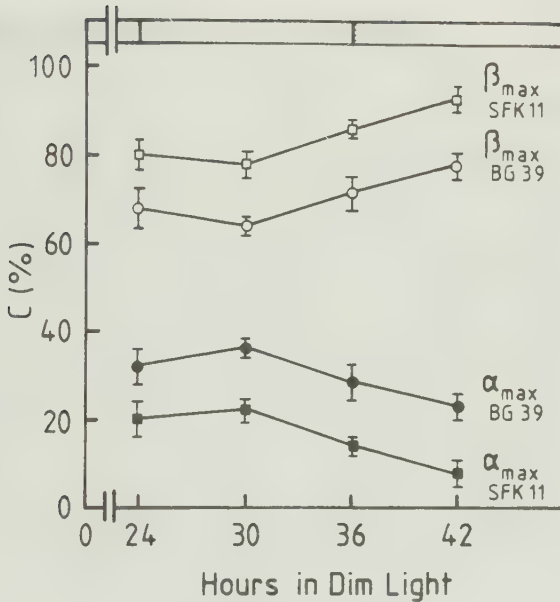


Abb. 20: Prozentuale Anteile der α - und β -Zentren im Verlauf der Rhythmusversuche.
Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 2 Experimenten mit jeweils 3-4 Messungen pro Zeitpunkt und Filtertyp.
SFK 11: Grünfilter; BG 39: Blaugrünfilter. C = α oder β .

Einen Überblick über die Veränderungen der PS II-Struktur zu verschiedenen Zeitpunkten der LDW- und Rhythmusversuche geben die Tabellen 12 und 13 und die Abb. 20 und 21. Die relativen Anteile der PS II $_{\alpha}$ - und PS II $_{\beta}$ -Zentren, ausgedrückt als $\alpha_{\max}$ und $\beta_{\max}$, zeigen sich zu verschiedenen Meßzeitpunkten verändert. Im Verlauf der Rhythmusversuche liegt der relative Anteil der PS II $_{\alpha}$ -Zentren, $\alpha_{\max}$, bei Anregung mit dem Filter SFK 11 zu Beginn der subjektiven Tagphase (CT 24) schon bei etwa 20%, steigt bis zur Mitte des Tages (CT 30) nur noch wenig an, und fällt dann bis zur Mitte der subjektiven Nachtphase auf 8% (Tab. 12, Abb. 20). Bei Anregung mit dem Filter BG 39 ergeben sich ähnliche Tendenzen; die Werte für $\alpha_{\max}$ liegen um etwa 15% höher als die mit dem Filter SFK 11 ermittelten relativen Anteile (Tab. 12, Abb. 20). Im Verlauf der LDW-Versuche steigt bis zur 30. Stunde der Lichtphase

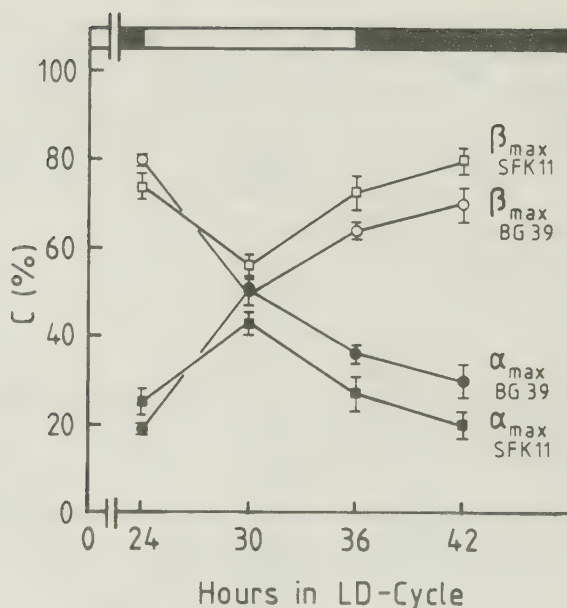


Abb. 21: Prozentuale Anteile der α - und β -Zentren in Verlauf der LDW-Versuche.

(L 30) der Anteil der α -Zentren, der β -Anteil sinkt parallel dazu, so daß etwa in der Mitte der Lichtphase der höchste Anteil der PS II $_{\alpha}$ -Zentren erreicht wird. Nach diesem Zeitpunkt beginnt der gegenläufige Prozeß: der α -Anteil sinkt, während der Anteil der β -Zentren steigt, so daß in der Mitte der subjektiven Nachtphase, bzw. der Dunkelphase (D 42), der Anteil der β -Zentren am höchsten ist (Tab. 13, Abb. 21).

Die Geschwindigkeit, mit der PS II $_{\alpha}$ Lichtquanten einfängt (k_{α}), kann über die Tag- bzw. Lichtphase auf einem relativ hohen Niveau gehalten werden, während sie in der Nacht- bzw. Dunkelphase absinkt (Tab. 12, 13).

Veränderungen von k_{α} und k_{β} sind direkt mit Variationen der Größe der Lichtsammelkomplexe, d.h., mit Veränderungen des Verhältnisses von funktionell gebundenen Chlorophyllmolekülen zum Reaktionszentrum gleichzusetzen. Demnach läßt sich aus den in den Tabellen 12 und 13 zusammengestellten Werten von k_{α} und k_{β} sowie des Faktors k_{α}/k_{β} ablesen, daß PS II $_{\alpha}$ gegenüber PS II $_{\beta}$ einen 6-7fach größeren (Rhythmusversuche), bzw. 7-10fach größeren (LDW-Versuche) Absorptionsquerschnitt besitzt.

4. Diskussion

Dieses Kapitel wird in zwei Abschnitten die wichtigsten Ergebnisse dieser Arbeit diskutieren. Dazu werden im ersten Abschnitt (4.1) die bekannten Ergebnisse zur molekularen Architektur der Pigment-Protein-Komplexe des PS I (4.1.1), des PS II und der Antennenkomplexe (4.1.2) aus den Rhodophyta, Chromophyta, Chlorophyta und höheren Pflanzen dargestellt, um die in dieser Arbeit ermittelten Resultate zur Pigment- und Polypeptidzusammensetzung der PPC aus *Gonyaulax* und Spinat in diesem Zusammenhang zu debattieren. Im Rahmen dieser Diskussion werden Modellvorstellungen hinsichtlich der Organisation der Chlorophylle und Carotinoide in den PPC und der Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran von *Gonyaulax* entworfen.

Im anschließenden Abschnitt (4.2) wird der Frage nach den molekularen Vorgängen bei der circadianen Photosyntheserhythmik nachgegangen. Die aus den Rhythmus- und Licht-Dunkel-Wechsel-Versuchen gewonnenen Resultate der Elektronentransportmessungen, der Pigmentanalysen der Thylakoidmembranen und Pigment-Protein-Komplexe sowie der Fluoreszenzinduktionsuntersuchungen zur Analyse der PS II-Struktur werden im Hinblick auf eine Veränderung der strukturellen und funktionellen Organisation der PPC als Folge der circadianen Rhythmik diskutiert.

4.1 Molekulare Architektur der Pigment-Protein-Komplexe in den Thylakoidmembranen von *Gonyaulax* und Spinat

4.1.1 Die PS I-Komplexe

In allen Algenklassen findet man einen Chl a-Protein-Komplex, der hinsichtlich seiner spektralen und photochemischen Eigenschaften dem P700-Chl a-Protein höherer Pflanzen ähnlich ist.

Solche Komplexe wurden aus Rotalgen (REDLINGER & GANTT 1983), Cryptophyceae (INGRAM & HILLER 1983, LICHTLE et al. 1987, RHIEL et al. 1987), Dinophyceae (PREZELIN & ALBERTE 1978, BOCZAR & PREZELIN 1986, 1987), Diatomeae (ALBERTE et al. 1981, OWENS & WOLD 1986, CARON & BROWN 1987), Braunalgen (BARRETT & ANDERSON 1977, 1980) und aus Grünalgen (NECHUSHTAI & NELSON 1981) isoliert. Diese RZ-Proteine sollen, genauso wie in höheren Pflanzen, neben P700 etwa 40-150 Chl a und 10-15 β -Carotin an Polypeptide von 50-70 kDa binden (SIEFERMANN-HARMS 1985).

Eine detaillierte Untersuchung der Polypeptidzusammensetzung photochemisch aktiver PS I-Präparationen aus höheren Pflanzen, die zur NADP^+ -Photoreduktion befähigt waren, erbrachte neben den 70 kDa-Polypeptiden noch einige Polypeptide mit geringerem Molekulargewicht. Die PS I-Partikel enthielten neben dem 70 kDa-Polypeptid fünf weitere Proteine von 25, 20, 18, 16 und 8 kDa (BENGIS & NELSON 1975, 1977). Behandlung mit SDS führte zum Verlust aller kleineren Polypeptide. Der Verlust konnte mit dem Entfernen des Elektronenakzeptors A_2 und der Eisen-Schwefel Zentren A und B korreliert werden. Die 20 kDa-Komponente ist für den Elektronentransport von Plastocyanin zum P700 notwendig.

Einen wichtigen Anteil zur Aufklärung der Struktur und Zusammensetzung des PS I-Komplexes höherer Pflanzen lieferten PS I-Partikel, die nach der Methode von MULLET et al. (1980) isoliert wurden. Nach Triton X-100-Solubilisierung konnte ein 'nativer' PS I-Komplex (PS I-200) isoliert werden, der neben Chl *a* und β -Carotin auch Chl *b* enthielt. Dessen Pigment-Proteine sind in zwei Komponenten organisiert: einer Core-Komponente, die P700 und eng assoziierte Chl *a*-Antennen in einem Chl *a*/P700 Verhältnis von 65 enthält, ähnlich der PS I-RZ-Präparation von BENGIS & NELSON (1977), und einer Antennenkomponente. Die Reaktionszentrum-Proteine höherer Pflanzen sind mit einer speziellen Antenne assoziiert, dem LHC I, und bilden einen PS I-Suprakomplex (ANDERSON et al. 1983, HAWORTH et al. 1983). Dieser Antennenkomplex enthält drei Polypeptide von 23, 22 und 20 kDa in zwei Pigment-Protein-Komplexen LHC Ia und LHC Ib, die beide ein Chl *a/b*-Verhältnis von 3-4 aufwiesen (LAM et al. 1984a). Die Arbeit von LAM et al. (1984b) und neuere Berichte von MACHOLD et al. (1986) und NECHUSHTAI et al. (1987) zeigen jedoch, daß die Chl *b*- und Carotinoid-haltige Antenne des PS I nur ein Apoprotein von ungefähr 20 kDa enthält.

In der vorliegenden Arbeit wurden aus SDS-solubilisierten Thylakoidmembranen nach Deriphat-PAGE zwei PS I-Komplexe (PPC I, II) aus *Gonyaulax* sowie drei PS I-Komplexe (PPC 1-3) aus Spinat aufgetrennt und hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften, ihrer Pigment- und Polypeptidzusammensetzung charakterisiert. Zum Vergleich wurden die PS I-200-Komplexe aus Spinat (MULLET et al. 1980) einer Deriphat-PAGE unterworfen.

Die PPC I und II aus *Gonyaulax* binden etwa 3 Moleküle Chl c_2 , 14 Moleküle Peridinin, 8 Moleküle Dinoxanthin, 28 Moleküle Diadinoxanthin, 1 Molekül Diatoxanthin und 11 Moleküle β -Carotin pro 100 Moleküle Chl a (aus Tab. 5). Die Polypeptidanalyse ergab Proteine der Molekulargewichte von 53, 31 und 18.1 kDa (Abb. 8). Damit liegt das Molekulargewicht des Apoproteins des PS I mit 53 kDa in der Größenordnung von 50-70 kDa, die für Reaktionszentrumproteine des PS I höherer Pflanzen, verschiedener Algenklassen und Cyanobakterien angegeben wurde. Aus dem unmittelbaren Vergleich der Molekulargewichte des PS I-Reaktionszentrums aus Spinat (PPC 2+3) (Abb. 12) mit denen der RZ-Apoproteine in *Gonyaulax* wird deutlich, daß sie sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes unterscheiden. Dabei entspricht das Molekulargewicht des PS I-RZ-Apoproteins aus *Gonyaulax* den in Cyanobakterien ermittelten von 50-54 kDa (LARKUM & BARRETT 1983, SIEFERMANN-HARMS 1985). BOZAR & PREZELIN (1987) hingegen fanden in ihrem PS I-Komplex aus *Gonyaulax* Polypeptide von 106, 61 und 55 kDa, bei höheren Lichtintensitäten dagegen Proteine mit Molekulargewichten von 74, 70, 59, 23 und 16 kDa. Die Bedeutung dieser verschiedenen Polypeptidzusammensetzungen sowie die Beziehung zu den hier beschriebenen PS I-Komplexen aus *Gonyaulax* ist unklar.

Während das Vorhandensein einer spezifischen Antenne des PS I für Grünalgen (WOLLMAN & BENNOUN 1982, ISH-SHALOM & OHAD 1983) und höhere Pflanzen (HAWORTH et al. 1983, LAM et al. 1984a, ORTIZ et al. 1984) nachgewiesen ist, gibt es erst wenig Hinweise darüber, ob andere Algen Antennenproteine enthalten, die mit dem PS I assoziiert sind.

Wie bereits dargestellt, binden die PS I-Komplexe aus *Gonyaulax* kleinere Polypeptide von 31 und 18.1 kDa (Abb. 8). Aufgrund der SDS-Solubilisierung kann vermutlich ausgeschlossen werden, daß es sich dabei um Proteine von Elektronendonoren oder -akzeptoren handelt. Aus der in Tabelle 5 zusammengestellten Pigmentzusammensetzung ist zu ersehen, daß die Komplexe signifikante Mengen von Xanthophyllen binden. Deshalb kann auf eine Assoziation von Antennenkomplexen an das RZ-Protein des PS I in PPC I und II geschlossen werden. In den PPC I und II ist in Übereinstimmung mit den PS I-Komplexen aus Braunalgen (ANDERSON & BARRETT 1979, PEYRIERE et al. 1984) und Cryptophyceae (LICHTLE et al. 1987) wenig Chl c_2 gebunden. Folglich kann Chl c_2 nicht eine dem Chl b in den PS I-Antennen höherer Pflanzen analoge Rolle spielen.

Aus den relativen Pigmentzusammensetzungen der Tabelle 5 läßt sich ermitteln, daß nur etwa 2% der Pigmente innerhalb von PPC I Chl c_2 -Moleküle sind, während Chl a und β -Carotin ungefähr 69% und die Xanthophylle etwa 29% der Pigmente ausmachen. Diadinoxanthin ist das vorherrschende Xanthophyll in diesem Komplex.

Von einer spezifischen Anreicherung von Xanthophyllen im PS I von Algen wurde schon früher berichtet. So ist Violaxanthin in PS I-Partikeln der Grünalge *Chlorella fusca* angereichert (GRIMME 1974). BARRETT & ANDERSON (1980) fanden, daß der P700-Chl a -Komplex der Braunalge *Acrocarpia paniculata* mit einem Chl $a/c_1/c_2$ -Violaxanthin-Komplex assoziiert ist. In diesem Komplex nimmt Violaxanthin nicht am Energietransfer teil. Für eine weitere Braunalge konnte eine Anreicherung von Violaxanthin in der PS I-Core-Antenne gezeigt werden (LICHTLE et al. 1987). CUNNINGHAM & SCHIFF (1986) fanden, daß Diadinoxanthin in großen Mengen in ihrem PS I-Komplex CP 1a aus der Grünalge *Euglena gracilis* vorhanden war. Diadinoxanthin ist genauso wie Violaxanthin in einen Xanthophyllzyklus involviert. Violaxanthin wird in diesem Zyklus über eine lichtinduzierte De-Epoxidase zum epoxidfreien Zeaxanthin. Zeaxanthin kann durch eine Epoxidase wieder zum Violaxanthin umgewandelt werden (SIEFERMANN-HARMS 1980). In dieser zyklischen Reaktionsfolge reagiert das epoxidhaltige Diadinoxanthin in entsprechender Weise zum Diatoxanthin (LARKUM & BARRETT 1983). Die physiologische Funktion dieses Zyklus ist unklar. In einer neueren Arbeit konnte die enzymatische Bildung von Zeaxanthin aus Violaxanthin bei hohen Lichtintensitäten auf eine spezifische Rolle des Xanthophyllzyklus gegen Photodesstruktion des Photosyntheseapparates *in vivo* zurückgeführt werden (DEMMIG et al. 1987, 1988). Möglicherweise kann diese Schutzfunktion in Zusammenhang mit dem PS I gesehen werden.

PPC 1 aus Spinat bindet etwa 1 Molekül Neoxanthin, 4 Moleküle Violaxanthin, 6 Moleküle Lutein, 9 Moleküle Chl b und 17 Moleküle β -Carotin pro 100 Moleküle Chl a (Tab. 6). Damit zeigt das Pigmentmuster des PPC 1, bis auf den verringerten Chl b -Gehalt, Ähnlichkeiten mit dem Muster des nativen PS I-200-Komplexes (vergl. DAMM 1987). Der geringe Gehalt an Chl b mag darauf zurückzuführen sein, daß PPC 1 kein LHC II enthält. Die Polypeptide des LHC II fehlen (Abb. 12). Andererseits wurde für PS I-Präparationen mit Chl a/b -Verhältnissen >6 ein partieller Verlust von LHC I

nachgewiesen (BASSI & SIMPSON 1987). Die Pigmentanalyse der Bande mit der geringsten elektrophoretischen Mobilität (93 kDa-Bande) nach Deriphat-PAGE SDS-solubilisierter PS I-200-Partikel spiegelt ebenfalls ein ähnliches Resultat wieder (Tab. 7).

PPC 1 aus Spinat bindet neben den für das Reaktionszentrum des PS I typischen Apoproteinen von 62 und 56 kDa ein Protein von 20 kDa (Abb. 12), das nach den oben geschilderten Literaturdaten das Apoprotein des LHC I sein könnte. Daneben sind Polypeptide des CF_1 -Kopplungsfaktors von 56 und 52 kDa im Spinat PS I-Komplex vorhanden, so daß geschlossen werden muß, daß während der Präparation der Thylakoidmembranen nicht alles CF_1 von der Membran entfernt werden konnte. Andererseits wurden enge strukturelle und funktionelle Beziehungen zwischen dem PS I und dem Kopplungsfaktor-Komplex nachgewiesen (LAM & MALKIN 1983, HUCHZERMAYER et al. 1986), so daß das gemeinsame Auftreten der Polypeptide nicht überraschend ist.

Die PPC 2+3 binden neben großen Mengen Chl *a* und β -Carotin (17 Moleküle/ 100 Moleküle Chl *a*) etwa 1 Molekül Violaxanthin, 2 Moleküle Lutein und 5 Moleküle Chl *b* pro 100 Moleküle Chl *a* (Tab. 6). Damit weisen diese Komplexe hinsichtlich ihres Pigmentmusters ähnliche Charakteristika auf wie die Reaktionszentrum-Komplexe des PS I, die nach Abspaltung der PS I-spezifischen Antenne aus PS I-200-Komplexen gewonnen werden konnten (DAMM 1987). Obwohl die Polypeptidanalyse keinen Hinweis auf das Vorhandensein von Apoproteinen von Antennenkomplexen gibt (Abb. 12), können die Xanthophylle in den PPC 2+3 möglicherweise auf Reste von Lichtsammelkomplexen zurückgeführt werden, die an diesem Reaktionszentrumkomplex des PS I verblieben sind. Ein Teil des Chl *b* hingegen kann als integraler Bestandteil des Reaktionszentrumkomplexes betrachtet werden. So ergab eine eigene Isolierung von PS I-Reaktionszentrum-Komplexen aus Spinat nach ALBERTE & THORNER (1978) in hochangereicherten PS I-Präparationen mit nur etwa 23 Molekülen Chl *a*/P700 noch immer die Anwesenheit von 1 Molekül Chl *b* (unveröffentlichte Daten). IKEGAMI & ITOH (1987) fanden in einer PS I-Fraktion nach Ätherextraktion mit einem Chl *a* /P700-Verhältnis von 8 ebenfalls 1 Molekül Chl *b*, so daß die Autoren annehmen, daß Chl *b* ein Elektronenakzeptor nahe A_2 im Reaktionszentrum des PS I ist.

4.1.2 Die PS II-Komplexe und assoziierte Antennenkomplexe

Für PS II-Reaktionszentrumkomplexe wird genauso wie für die PS I-Komplexe schon seit längerem angenommen, daß sie in allen sauerstoffentwickelnden Organismen einheitlich sind (ANDERSON & BARRETT 1986), obwohl erst in letzter Zeit die Identität der Reaktionszentropolypeptide des PS II geklärt werden konnte. Während bisher die größte Untereinheit des PS II-Core-Komplexes höherer Pflanzen von etwa 50 kDa als P680-Apoprotein angesehen wurde, bestehen aktuelle Präparationen eines aktiven PS II-Reaktionszentrums aus den D1- und D2-Proteinen von jeweils etwa 30 kDa und Cytochrom *b*-559 (NANBA & SATOH 1987, SATOH 1988).

Obwohl PS I-Komplexe für die meisten Algenklassen beschrieben wurden, konnte nur in wenigen Fällen auch über das PS II-Reaktionszentrum berichtet werden. Aus einer Diatomee wurde von HOLDSWORTH & ARSHAD (1977) ein Partikel isoliert, der sowohl Antennenproteine als auch das photochemisch aktive PS II-Reaktionszentrum bindet, und pro 100 Moleküle Chl *a* etwa 50 Moleküle Chl *c* und 50 Moleküle Fucoxanthin enthält. Für Cryptophyceae, die als akzessorische Pigmente hauptsächlich Chl *c*₂ und Phycoerythrin enthalten, wurden zwei PS II-Komplexe charakterisiert: ein Phycoerythrin-Xanthophyll-PS II-Komplex (LICHTLE et al. 1987) und ein Chl *a/c*₂-PS II-Komplex (INGRAM & HILLER 1983, LICHTLE et al. 1987). Beide Komplexe binden pro 100 Moleküle Chl *a* zwischen 13 und 21 Moleküle Chl *c*₂ sowie 42-49 Moleküle akzessorischer Xanthophylle (LICHTLE et al. 1987).

Die PS II-Komplexe sind in der Regel mit xanthophyllhaltigen Antennen assoziiert. Das trifft auch für die in dieser Arbeit isolierten PS II-Komplexe aus *Gonyaulax* und Spinat zu. Deshalb werden Literaturdaten zur Zusammensetzung und Organisation von Antennenkomplexen in Algen und höheren Pflanzen vorangestellt, um eine Einordnung der eigenen Daten zur Pigment- und Polypeptidzusammensetzung der PS II- und Antennenkomplexe zu erleichtern.

Aus Cryptophyceae (INGRAM & HILLER 1983, RHIEL et al. 1987), Diatomeae (GUGLIEMELLI et al. 1981, GUGLIEMELLI 1984, FRIEDMAN & ALBERTE 1984, 1986, OWENS & WOLD 1986), Braunalgen (BARRETT & ANDERSON 1980, ALBERTE et al. 1981, CARON et al. 1985) und auch aus Dinoflagellaten (BOCZAR et al. 1980) konnten Chl *a/c*-Xanthophyll-Antennenproteine isoliert und partiell charakterisiert werden. Gemeinsames Merkmal dieser Antennenkomplexe ist ihr hoher Xanthophyllgehalt im Gegensatz zu den Reaktionszentrumkomplexen.

Es lassen sich vier Typen von Chl *a/c*-Xanthophyll-Proteinen hinsichtlich ihrer Chl *a/c*-Verhältnisse unterscheiden (SIEFERMANN-HARMS 1985).

Der erste Typ mit Chl *a/c*-Verhältnissen von ≈ 2 wurde aus Diatomeen und Braunalgen isoliert. Generell sind diese mit dem PS II assoziierten Antennenkomplexe der Diatomeen und Braunalgen angereichert mit Chl *c* und Fucoxanthin, binden etwa 40-50% des gesamten Chl *a*, und zeigen Energietransfer von Carotinoiden und Chl *c* zum Chl *a* (ALBERTE et al. 1981, GUGLIEMELLI et al. 1981). Die Chl *a/c*-Fucoxanthin-Proteine aus Diatomeen binden pro 100 Moleküle Chl *a* etwa 40-50 Moleküle Chl *c* und 200 Moleküle Fucoxanthin (GUGLIEMELLI 1984, FRIEDMAN & ALBERTE 1984, OWENS & WOLD 1986). Neben Fucoxanthin binden diese Komplexe weitere Xanthophylle. Eine der wenigen HPLC-Pigmentanalysen weist neben Neofucoxanthin geringe Mengen von Diadinoxanthin und Diatoxanthin als Bestandteile des Antennenkomplexes auf (GUGLIEMELLI 1981). Aus Braunalgen wurde ein ähnlicher Komplex beschrieben, der 35% des gesamten Chl *a*, 50 Moleküle Chl *c*₂ und 100 Moleküle Fucoxanthin pro 100 Moleküle Chl *a* enthielt (BARRETT & ANDERSON 1980). Die Polypeptidausstattung dieser Komplexe ist recht einheitlich, Apoproteine von 15-20 kDa wurden in den meisten Fällen beschrieben (GUGLIEMELLI 1984, FRIEDMAN & ALBERTE 1984, 1986, OWENS 1986). Neben diesen Antennenkomplexen wurde von weiteren berichtet, die Chl *a* und Chl *c*, aber kein Fucoxanthin enthalten und nur einen kleinen Teil der Pigmente enthalten. Die Bedeutung dieser Chl *a/c*-Proteine ist nicht klar. Einige Autoren deuten sie als Resultate selektiven Pigmentverlustes aufgrund der Solubilisierungsbedingungen und damit als Degradationsprodukte (FRIEDMAN & ALBERTE 1984), andere werten sie als *in vivo* LHC-Komplexe (OWENS & WOLD 1986).

Der zweite Typ eines Antennenkomplexes wurde in einer Cryptophyceae gefunden, hat ein Chl *a/c*-Verhältnis ≥ 1 , und bindet etwa 57% des gesamten Chl *a* (INGRAM & HILLER 1983). Neben 100 Molekülen Chl *a* enthält er 70 Moleküle Chl *c*₂ und vermutlich Diadinoxanthin.

Der dritte und der vierte Typ sind Komplexe mit Chl *a/c*-Verhältnissen ≈ 1 bzw. ≈ 1 . Hier ist zunächst der Antennenkomplex zu nennen, der bereits im Zusammenhang mit dem PS I diskutiert wurde, der Chl *a/c*_{1/c}₂-Violaxanthin-Komplex. Dieser Komplex

bindet pro 100 Moleküle Chl *a* nur je 12.5 Moleküle der anderen Pigmente. Das Chl *a* /*c*-Protein mit einem Chl *a* /*c* -Verhältnis ≈ 1 schließlich wurde aus Dinoflagellaten isoliert. Hier kommen zwischen 300-480 Moleküle Chl c_2 auf 100 Moleküle Chl *a* (BOCZAR et al. 1980, BOCZAR & PREZELIN 1987).

Eine Zuordnung der in dieser Arbeit isolierten PS II- und Antennenkomplexe aus *Gonyaulax* zu den angegebenen Komplexen ist im Hinblick auf diese Diversität der Chl *a*/*c*-Proteinkomplexe schwierig. Zudem differieren selbst die aus einer Algenklasse isolierten Komplexe aufgrund unterschiedlicher Präparations- und Isolierungsbedingungen in ihrer Pigmentzusammensetzung.

Die dargestellten Ergebnisse der Pigment- und Polypeptidanalysen für den PPC V aus *Gonyaulax* (Tab. 5, Abb. 8) lassen auf einen PS II-Komplex mit assoziierten Antennen in dieser Bande schließen. Bisher konnte kein Pigment-Protein-Komplex aus Dinoflagellaten dem PS II zugeordnet werden (vergl. BOCZAR & PREZELIN 1987). PPC V bindet pro 100 Moleküle Chl *a* etwa 70 Moleküle Peridinin, 11 Moleküle Chl c_2 sowie 35 Moleküle der anderen akzessorischen Xanthophylle, und weist damit hinsichtlich des Pigmentmusters ähnliche Charakteristika auf wie der von HOLDSWORTH & ARSHAD (1977) aus Diatomeen und von LICHTLE et al. (1987) aus Cryptophyceae isolierte PS II-Komplex. Neben den Polypeptiden des PS II-Reaktionszentrums findet man in PPC V unter anderem auch ein 19.1 kDa-Polypeptid (Abb. 8). Proteine in dieser Größenordnung werden, wie oben geschildert, als Apoproteine von Antennenkomplexen in Diatomeen und Braunalgen angegeben.

PPC IV bindet demgegenüber nahezu doppelt soviel Peridinin pro Chl *a* als Thylakoidmembranen und kein β -Carotin (Tab. 5). Der hohe Xanthophyllgehalt und das Fehlen von β -Carotin deuten auf einen Komplex mit ausschließlicher Antennenfunktion. Damit kann dieses Chl *a*/*c*-Peridinin-Protein analog den Chl *a*/*c*-Fucoxanthin-Komplexen aus Braunalgen und Diatomeen gesehen werden. Solch ein Lichtsammelkomplex aus der Thylakoidmembran von Dinoflagellaten konnte erstmals von KNOETZEL et al. (1987) hinsichtlich seines Pigmentmusters charakterisiert werden. Mit der vorliegenden Arbeit wird zusätzlich die Polypeptidzusammensetzung angegeben (Abb. 8).

PPC III ist gegenüber Thylakoidmembranen nicht nur mit Peridinin, sondern auch mit $\text{Chl } c_2$ angereichert. Etwa 60% des gesamten $\text{Chl } c_2$ sind in PPC III lokalisiert. BOCZAR et al. (1980) und BOCZAR & PREZELIN (1987) konnten aus Dinoflagellaten ebenfalls einen Komplex isolieren, der mit $\text{Chl } c_2$ angereichert war, und in dem etwa 40-80% des gesamten $\text{Chl } c_2$ gebunden waren. Nach dünn-schichtchromatographischen Analysen hingegen soll dieser Komplex kein Peridinin, wohl aber andere gelbe Xanthophylle binden (BOCZAR & PREZELIN 1987). Weiterhin entspricht PPC III hinsichtlich des $\text{Chl } a/c_2$ -Verhältnisses von etwa 3/1 nicht dem von BOCZAR et al. (1980) isolierten Antennenkomplex mit einem $\text{Chl } a/c_2$ -Verhältnis von 0.32/1, so daß es über den Aufbau des Komplexes, in dem das $\text{Chl } c$ der Dinoflagellaten konzentriert ist, zur Zeit unterschiedliche Vorstellungen gibt.

Es ist ebenfalls denkbar, daß in Dinoflagellaten der Hauptteil des $\text{Chl } c_2$ in Form von reinen $\text{Chl } a/c_2$ -Proteinen bzw. $\text{Chl } c_2$ -Proteinen vorliegt (INGRAM & HILLER 1983, BOCZAR & PREZELIN 1986). Der Nachweis von Peridinin in PPC III (Tab. 5) (und auch in PPC IV und V) ist möglicherweise auf die partielle Einbettung des wasserlöslichen PCP in die Membran zurückzuführen. Einen Hinweis darauf, daß das wasserlösliche PCP eine Rolle bei der Organisation der membran-intrinsischen Antennenkomplexe spielt und mit ihnen assoziiert ist, liefern die Ergebnisse der Polypeptidanalysen der PPC III-V (Abb. 8): man findet neben den Polypeptiden von 19.1 kDa, die wie oben dargestellt als Apoproteine der $\text{Chl } a/c$ -Fucoxanthin-Proteine diskutiert werden, ein 32 kDa-Protein, das das Apoprotein des PCP sein kann.

Neben diesen komplexen Vorstellungen zur Organisation von Antennenkomplexen vor allem in PPC III, deuten die in dieser Arbeit ermittelten Resultate darauf hin, daß PPC III ebenfalls PS II-Komplexe bindet (siehe Abschnitt 4.2). PPC III enthält genauso wie die PS I-Komplexe (PPC I, II) und der PS II-Komplex (PPC V) in *Gonyaulax* β -Carotin (Tab. 5); im Polypeptidmuster sind die Proteine des PS II-RZ nachweisbar (Abb. 8). Möglicherweise ist ständig ein gewisser Teil der PS II-Komplexe (PPC V) Bestandteil des PPC III. Die Deriphat-PAGE ermöglicht eine hinreichend schonende Auftrennung der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax*, so daß solche komplexen Assoziationen während der Elektrophorese erhalten bleiben. Somit ist diese Methode offensichtlich für eine

Auftrennung der PPC aus Thylakoidmembranen von Dinoflagellaten geeignet, wofür der geringe Anteil an freien Pigmenten (5-10% des Chl *a*) nach Elektrophorese solubilisierter Membranen spricht.

Das wasserlösliche Peridinin-Chl *a*-Protein bindet ausschließlich diese beiden Pigmente, und zwar etwa im Verhältnis 4/1 (Tab. 5) an Polypeptide von 32 kDa. Diese Pigment- und Polypeptiddaten sind in Übereinstimmung mit den zahlreichen anderen Arbeiten zur Struktur und Funktion des PCP (PREZELIN & HAXO 1976, SIEGELMAN et al. 1977).

Die typischen Antennenproteine von höheren Pflanzen und Grünalgen sind Chl *a/b*-Xanthophyll-Proteine. LHC II bindet 40-60% des gesamten Chlorophylls der Thylakoidmembran, und ist in der Regel mit PS II-Komplexen assoziiert. Sein Chl *a/b*-Verhältnis liegt zwischen 1.0 und 1.5, der Komplex bindet kein β -Carotin und zeichnet sich durch einen hohen Xanthophyllgehalt aus (BRAUMANN et al. 1982, MENDER et al. 1984, BARBER 1985). Das Antennensystem des Photosystems II höherer Pflanzen besteht jedoch nicht nur LHC II, sondern ist komplex organisiert. Neben dem LHC II, der etwa drei Polypeptide von 25-28 kDa enthält, transferieren mindestens drei weitere Chl *a/b*-Proteine, CP 29 (CANN & GREEN 1980), CP 26 und CP 24 (BASSI et al. 1987) Excitonen zum PS II-RZ. LHC II ist dabei eine multifunktionale Komponente, verantwortlich für das Lichtsammeln, die Regulation des Excitonentransfers zwischen den beiden Photosystemen über reversible Phosphorylierung, und die Stapelung der Thylakoidmembranen (BENNETT 1983).

Nach den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen ist nach Deriphat-PAGE solubilisierter Thylakoidmembranen aus Spinat das PS II in den PPC 4 und 5 lokalisiert. Die zur weiteren Identifizierung durchgeführte Auftrennung von isolierten PS II-Komplexen (BBY-Partikel) liefert zwei Banden im Gel, deren elektrophoretische Mobilitäten denen der PPC 4 und 5 entsprechen (Abb. 9). Im Pigmentmuster der PPC 4 und 5 tritt Lutein als Markerpigment des LHC II auf (Tab. 6), und man findet die Polypeptide des PS II-Core-Komplexes und des LHC II in diesen beiden Banden (Abb. 12). Man erhält nach Deriphat-PAGE also PS II-Komplexe, die mit ihren Antennen assoziiert geblieben sind, wobei LHC II Bestandteil dieses Antennensystems ist.

Nach Deriphat-PAGE treten keine freien Antennenkomplexe auf, so daß diese Untersuchungen an Spinat bestätigen, daß die Deriphat-PAGE eine schonende Methode zur Auftrennung von Pigment-Protein-Komplexen ist.

Mit den in dieser Arbeit ermittelten Pigment- und Polypeptidaten der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* (Tab. 5, Abb. 8) wird ein Modell zur Organisation der Komplexe in der Thylakoidmembran vorgeschlagen (Abb. 22). Für Dinoflagellaten, Braunalgen und Diatomeen wurden einheitliche Chl *a*/P700-Verhältnisse der Thylakoidmembranen von etwa 600 berichtet (PREZELIN & ALBERTE 1978, ALBERTE et al. 1981). Unter Zugrundelegung dieses Verhältnisses wird mit Hilfe der prozentualen Verteilung des Chl *a* zwischen den Pigment-Protein-Komplexen von *Gonyaulax* eine Angabe zur jeweiligen Anzahl der Pigmentmoleküle in den PPC möglich.

PPC I bindet etwa 20 % des gesamten Chl *a*, umgerechnet also 120 Moleküle Chl *a* (Abb. 22). Aus Dinoflagellaten isolierte P700-Chl *a*-Proteine binden etwa 50 Chl *a*/P700 und 7% des gesamten Chl *a* (PREZELIN & ALBERTE 1978). Das ist in Übereinstimmung mit Vorstellungen, nach denen 40-60 Chl *a*/P700 und 5-10 β -Carotin an das P700-Chl *a*-Protein gebunden sind (ANDERSON & BARRETT 1986), so daß im Modell 50 Moleküle Chl *a* und die 13 Moleküle β -Carotin des PPC I mit den 53 kDa-Apoproteinen dieses Komplexes assoziiert wurden. Die restlichen Pigmente und Polypeptide wurden einer PS I-spezifischen Antenne zugeordnet (Abb. 22).

PPC V bindet etwa 30% des gesamten Chl *a*, also etwa 180 Moleküle Chl *a*. PS II-Core-Komplexe binden in höheren Pflanzen etwa 10-15% der Chlorophylle und zwischen 50-60 Chl *a* /P680 (BARBER 1985). Unter der Annahme ähnlicher Daten für PPC V von *Gonyaulax* konnte die Pigmentzusammensetzung des in Abb. 22 dargestellten Komplexes errechnet werden.

Die PPC III und IV binden gemeinsam etwa 40% des gesamten Chl *a*, das PS II ist in diesen Pigment-Proteinen zu einem Komplex mit einem größeren Absorptionsquerschnitt organisiert. In diesem Komplex ist dann nahezu 70% des gesamten Chl c_2 konzentriert. Möglicherweise können die wasserlöslichen Peridinin-Chl *a*-Proteine an diesen PS II-Suprakomplex ankoppeln, und sich am Excitonen-transfer zum PS II beteiligen. Chl c_2 ist eigentlich ein - natürlich vorkommendes - Chlorophyllid, d.h., die Phytolkette an der Propionsäuregruppe am C-7 des Ringes IV fehlt (Abb. 3). Bei HPLC-Ana-

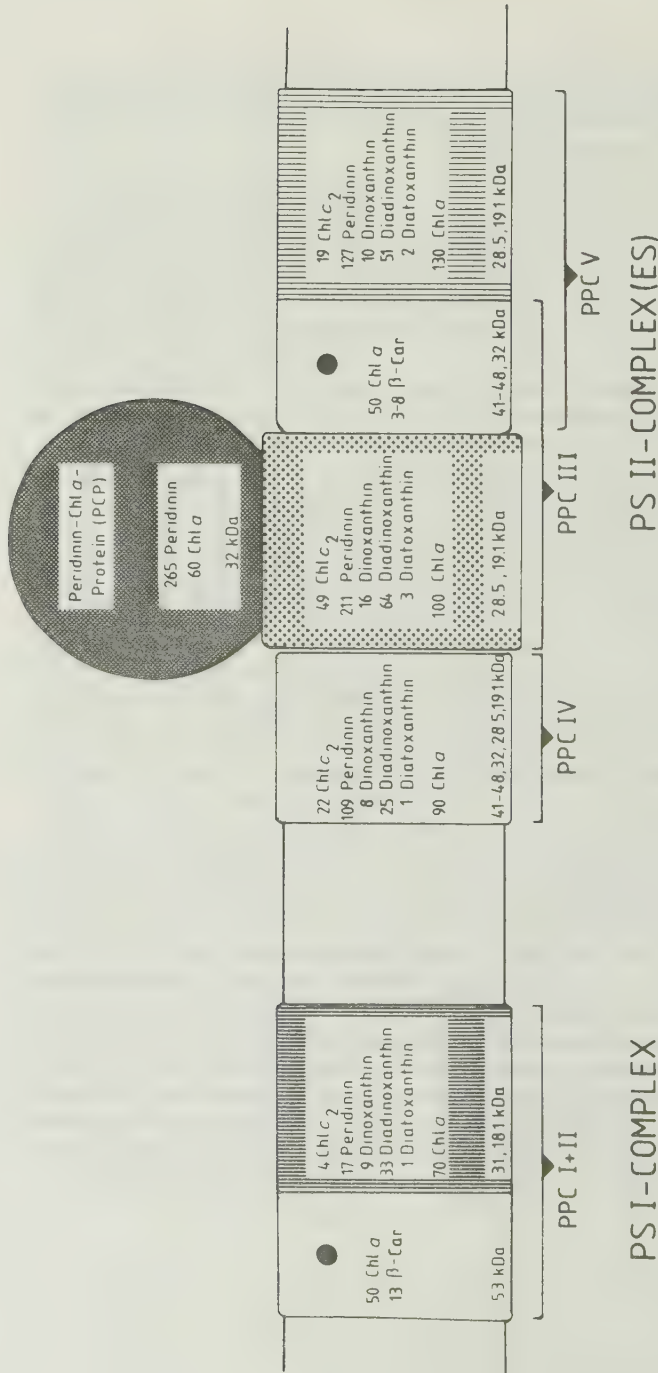


Abb. 22: Modell zur Organisation der Chlorophylle und Carotinoide in den membran-intrinsischen und dem wasserlöslichen Pigment-Protein-Komplex von *Gonyaulax polyedra*.
Reaktionszentrum: ●, Erläuterungen siehe Text.

lysen von Pigmenten aus *Gonyaulax* auf reversed-phase Material wird Chl c_2 als erstes Pigment von der Säule eluiert (Abb. 2). Dieses Chlorophyll bindet in peripheren Regionen der PPC, so daß eine für den Energietransfer enge räumliche Orientierung zu den Pigmenten des wasserlöslichen PCP möglich wird. Die wasserlöslichen Peridinin-Chl a-Proteine binden in *Gonyaulax* etwa 10% des Chl a und 30% des Peridinins (Tab. 11).

Aus diesen Daten zur Pigmentverteilung zwischen den PPC und der Pigmentzusammensetzung der Komplexe läßt sich die relative Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung für Thylakoidmembranen ermitteln, die in Übereinstimmung ist mit den in den Tabellen 5 und 10 angegebenen Daten. Kalkuliert man die Gesamtzahl der Pigmente in den Pigment-Protein-Komplexen, so ergibt sich eine Summe von etwa 1700 Chlorophyll- und Carotinoidmolekülen in dieser funktionellen PSU. Das ist in Übereinstimmung mit ähnlichen Berechnungen für die Organisation der Pigmente in Thylakoidmembranen von Braunalgen, wo etwa 1800 Pigmentmoleküle in der PSU organisiert sind (ALBERTE et al. 1981). Die Zusammenfassung einer solch großen Anzahl von Pigmentmolekülen in einer photosynthetischen Einheit der marinen Algen ist möglicherweise notwendig, um in ihrer natürlichen licht-limitierten Umgebung eine ausreichende Photosynthesekapazität zu erreichen.

4.2 Circadiane Photosyntheserhythmik und die strukturelle und funktionelle Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran von *Gonyaulax*

In photosynthetisierenden Dinoflagellaten konnte eine Anzahl von circadianen Rhythmen nachgewiesen werden (LONERGAN 1984, PREZELIN 1987). Für eine Reihe dieser Dinoflagellaten konnten unter konstanten Lichtbedingungen circadiane Veränderungen der Photosynthesekapazität festgestellt werden (PREZELIN et al. 1977, PREZELIN 1987), so daß eine circadiane Regulation der Photosynthese als gemeinsame Eigenschaft aller Dinoflagellaten angenommen wird (PREZELIN & SWEENEY 1977).

Die photosynthetische Sauerstoffentwicklung, gemessen als Sauerstoffentwicklung ganzer Zellen, zeigt in *Gonyaulax* ein rhythmisches Muster (Tab. 8, Abb. 14). Die Photosynthesekapazität ganzer Zellen ist am subjektiven Tag (CT 30) der Rhythmusversuche

etwa doppelt so hoch wie in der subjektiven Nacht (CT 42) (Tab. 8). Für die maximale Photosyntheserate, $P_{\max}$, lassen sich ebenfalls rhythmische Veränderungen nachweisen (Abb. 16). Das ist in Übereinstimmung mit vielen anderen Untersuchungen zur Photosyntheserhythmik in Algen (PREZELIN & SWEENEY 1977, PREZELIN et al. 1977, LONERGAN 1984). Dieses wurde als unterschiedliche Effektivität des Photosyntheseapparates zur Lichtverarbeitung gedeutet.

Die ermittelten Elektronentransportraten photosynthetisch aktiver Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* zeigen weder eine Rhythmik des Elektronentransportes über beide Photosysteme noch über das PS II oder über das PS I (Abb. 14, 15).

SAMUELSSON et al. (1983) berichten demgegenüber von einer Rhythmik der PS II-Aktivität in *Gonyaulax*, wobei die Veränderungen des Elektronentransportes im PS II denen des Gesamtelektronenflusses über beide Photosysteme entsprechen. Damit kann nach Ansicht der Autoren die PS II-Rhythmik für die Photosyntheserhythmik verantwortlich sein. Die berichteten Gesamtelektronentransportraten *in vitro* aber waren um den Faktor 5-10 niedriger im Vergleich zur Sauerstoffentwicklung *in vivo*.

Die Ergebnisse der Messungen zum *in vitro* Gesamtelektronentransport und zur *in vitro* PS II-Aktivität dieser Arbeit sind im Vergleich zur *in vivo* O_2 -Entwicklung nur etwa um den Faktor 3-6 niedriger (Tab. 8). Da aber die maximalen *in vivo*-Elektronentransportraten in *Gonyaulax in vitro* nicht annähernd erreicht werden, ist es unzulässig, eine PS II-Rhythmik als Ursache für eine circadiane Photosyntheserhythmik zu betrachten.

Die Höhe der photosynthetischen Elektronentransportraten von isolierten Thylakoidmembranen ist offensichtlich durch die Präparation der Membranen beeinträchtigt. So ist eine Inhibierung der PS I-Aktivität *in vitro*, gemessen als Elektronentransport von DCPIP/ASC nach MV, als Folge der durch Kationen hervorgerufenen Thylakoidmembranstapelung in höheren Pflanzen nachgewiesen worden (RAMANUJAM & BOSE 1983, BOSE & RAMANUJAM 1984). Eine Entfernung von Kationen, wie bei der hier durchgeführten Membranisolierung bei *Gonyaulax*, und damit eine Entstapelung der Membranen könnte als Folge der besseren Zugänglichkeit des Donors DCPIP zu einem im Vergleich zum *in vivo*-Elektronenfluß erhöhten Elektronentransport führen (Tab. 8). Demgegenüber ist das

wasserspaltende System aufgrund seiner exponierten Lokalisation an der Membranoberfläche generell sehr empfindlich. Es ist in seiner Funktion von dem Vorhandensein spezifischer Kationen und Anionen abhängig (MURATA & MIYAO 1985), so daß eine Membranisolierung sehr leicht zu einer Erniedrigung der PS II-Aktivität *in vitro* führen kann.

An isolierten Chloroplasten ('Class II') aus Grünalgen (LONERGAN & SARGENT 1979) und höheren Pflanzen (LONERGAN 1981) durchgeführten Messungen ergaben keine PS II-Rhythmik, obwohl der Gesamtelektronentransport über beide Photosysteme rhythmisch war. Es bietet sich an, isolierte Chloroplasten auch für Elektronentransportmessungen in *Gonyaulax* einzusetzen. Leider ist bisher keine Isolierung intakter Chloroplasten aus *Gonyaulax* möglich, so daß die Widersprüche, vor allem hinsichtlich der PS II-Rhythmik, nicht geklärt werden können.

Für die Zeitpunkte maximaler und minimaler Photosynthesekapazität der Rhythmus- und Licht-Dunkel-Wechsel-Versuche wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals die PPC aus Thylakoidmembranen aufgetrennt und die Chlorophyll- und Carotinoidzusammensetzung der Thylakoidmembranen und der Pigment-Protein-Komplexe aus *Gonyaulax* untersucht (Tab. 9, 10).

Das Pigmentmuster der Thylakoidmembranen bleibt während der Tag- bzw. Lichtphase im Vergleich zur Nacht- bzw. Dunkelfase unverändert. Nach der Elektrophorese SDS-solubilisierter Thylakoidmembranen lassen sich für die untersuchten Zeitpunkte der Rhythmus- und LDW-Versuche jeweils fünf Pigment-Protein-Komplexe auftrennen.

Für die PS I-Komplexe PPC I+II der Rhythmusversuche sowie den PS II-Komplex PPC V der LDW-Versuche kann auf eine einheitliche Organisation über die beobachteten Versuchszeiträume geschlossen werden (Tab. 9, 10). Demgegenüber lassen sich in den Rhythmusversuchen Veränderungen des Pigmentmusters für PPC V, in den LDW-Versuchen für PPC I+II nachweisen. Jedoch zeigen sich in den Rhythmus- als auch in den LDW-Versuchen deutliche Veränderungen des Xan/Chl *a*-Verhältnisses in den PPC III+IV: in der Nacht- bzw. Dunkelfase sind diese Verhältnisse gegenüber der Tag- bzw. Lichtphase deutlich erhöht. Diese Veränderungen im Pigmentmuster der gemeinsam eluierten PPC III und IV sind möglicherweise im Zusammenhang mit einer komplexen Organisation

des PS II-Antennensystems zu sehen. Während der subjektiven Tag- (Rhythmusversuche) bzw. Lichtphase (LDW-Versuche) sind vermutlich ein Teil der PS II-Komplexe PPC V (mit niedrigem Xan/Chl *a*-Verhältnis) jeweils in größerem Umfang mit PPC III assoziiert als während der Nacht- bzw. Dunkelphasen.

Zusätzliche Hinweise, daß Veränderungen der Organisation des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax* bei der circadianen Photosyntheserhythmik eine Rolle spielen, ergeben sich aus elektronenmikroskopischen Analysen der Chloroplasten und Thylakoidmembranen, sowie aus fluorimetrischen Untersuchungen. So konnten Veränderungen der Chloroplastenform und der Verteilung der Chloroplasten in Zellen von *Gonyaulax* gezeigt werden.

Die Chloroplasten sind während des subjektiven Tages länger gestreckt und dünner als während der subjektiven Nacht (HERMAN & SWEENEY 1975, RENSING et al. 1980). Diese Veränderungen sind begleitet von Veränderungen der Organisation der Thylakoidmembranen. Die Abstände zwischen den Thylakoidmembranstapeln sind während der subjektiven Tagphase größer. Die Stapelung der Thylakoidmembranen scheint einen tagesrhythmischen Wechsel durchzumachen. Während des subjektiven Tages überwiegen die gestreckten Chloroplastenregionen, hier liegen die Thylakoidmembranen in größerem Maße in 2er-Stapeln vor (HERMAN & SWEENEY 1975), während in der subjektiven Nacht vermehrt 3er-Stapel vorliegen (RENSING et al. 1980). Der Beginn dieser strukturellen Veränderungen lag jeweils in der subjektiven Nacht (HERMAN & SWEENEY 1975). Demgegenüber konnte nach elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Gefrierbruchpräparaten von *Gonyaulax*-Thylakoidmembranen keine Veränderung der Partikelgrößen in den EF_s- und PF_s-Histogrammen im Verlauf von Rhythmusversuchen beobachtet werden (SWEENEY 1981). Diese Partikel entsprechen möglicherweise den PS II-Komplexen in diesen Membranregionen. Einschränkend muß jedoch gesagt werden, daß erst zwei Berichte zur Feinstruktur der Thylakoidmembran von Dinoflagellaten vorliegen (SWEENEY 1981, DWARTE & VESK 1982), in denen nur zwei der vier möglichen Bruchoberflächen untersucht worden sind (vergl. STAEHELIN 1986).

Im Rahmen von Rhythmusuntersuchungen wurden bisher zwei charakteristische Phasen von Fluoreszenzinduktionskurven analysiert: die P-Phase (= 'peak'), d.h., das Maximum des schnellen Fluoreszenz-

anstiegs (~ 1 s nach Beginn der Kinetik) und die T-Phase ($\equiv$ 'terminal steady state'), d.h., der stationäre Endwert des Fluoreszenzabfalls (~ 4 min nach Beginn der Kinetik). SWEENEY et al. (1979) konnten eine Rhythmik der Fluoreszenzintensität, gemessen in der P-Phase der Fluoreszenzinduktionskurve, beobachten. Diese circadianen Veränderungen konnten auch bei Anwesenheit von DCMU gemessen werden. Das Maximum der Fluoreszenzintensität lag in der subjektiven Tagphase. Das Verhältnis der stationären Endwerte der Fluoreszenzinduktion, gemessen an einer Suspension von *Gonyaulax*-Zellen vor und nach der Inkubation mit DCMU (F/F_{DCMU}), zeigte einen circadianen Rhythmus mit Maximum in der Mitte der subjektiven Nachtphase (PREZELIN & SWEENEY 1977). Damit liegen die Maxima des Quotienten F/F_{DCMU} und der in der P-Phase gemessenen Fluoreszenzintensität jeweils in unterschiedlichen Phasen der Rhythmusversuche. Da sich während der subjektiven Tagphase eine erhöhte Fluoreszenz bei Anwesenheit von DCMU gegenüber der Nachtphase ergibt (siehe auch Abb. 18), ist das Verhältnis F/F_{DCMU} in der Tagphase kleiner. Nach Einfrieren der Membranen bei 77 K und Aufnahme von Tieftemperaturfluoreszenzkurven konnten in *Gonyaulax* keine circadianen Veränderungen festgestellt werden. Aufgrund dieser fluorimetrischen Untersuchungen wurde vermutet, daß ein circadianer Oszillator die Verteilung von photosynthetischen Einheiten in der Thylakoidmembran reguliert, so daß in der Nachtphase ein Teil der photosynthetischen Einheiten vom Energietransfer entkoppelt ist (PREZELIN & SWEENEY 1977, SWEENEY 1984).

In der vorliegenden Arbeit wurden, erstmals an Dinoflagellaten, Fluoreszenzinduktionsmessungen dunkeladaptierter, DCMU-behandelter Zellen durchgeführt, um eine Analyse der PS II-Struktur zu ermöglichen.

Die Fluoreszenzinduktionsmessungen an dunkeladaptierten, DCMU-behandelten *Gonyaulax*-Zellen bestätigen, daß auch in Dinoflagellaten zwei PS II-Formen unterschieden werden können. Die Interpretation der Daten der Fluoreszenzinduktionsmessungen beruht auf der Annahme einer PS II $_{\alpha/\beta}$ -Heterogenität in *Gonyaulax*. Die Fluoreszenzinduktionskurven verlaufen biphasisch und können als Summe zweier exponentieller Komponenten beschrieben werden. Aus der Analyse 1. Ordnung kann der Parameter β_{max} ermittelt werden (Abb. 18,19). Mit Hilfe dieses Parameters kann man die relativen Anteile von PS II $_{\alpha}$ und PS II $_{\beta}$ ermitteln. Der erhöhte Anteil der meßbaren α -Zentren bei bevorzugter Anregung des Antennenpigmen-

tes Peridinin (Filter BG 39) deutet darauf, daß dieser PS II-Typ gegenüber PS II_β vermehrt Chl *a/c*₂-Peridinin-Proteine bindet. Die Fluoreszenzinduktionsmessungen ergaben, daß PS II_α-Komplexe in *Gonyaulax* gegenüber den PS II_β-Komplexen einen 6-7fach größeren Absorptionsquerschnitt besitzen (Tab. 12). Um solche Antennengrößen zu erreichen, sind vermutlich auch wasserlösliche PCP an der Ausprägung der PS II_α-Charakteristik beteiligt und funktionell an die α-Form des PS II angekoppelt. In dem in Abbildung 22 vorgeschlagenen Modell zur Organisation der Pigmente in den PPC von *Gonyaulax* wurde dementsprechend eine Bindung der Peridinin-Chl *a*-Proteine an den PPC III angenommen.

Betrachtet man die mit dem Blaugrünfilter BG 39 ermittelten Anteile für PS II_α, so liegen in der Mitte des subjektiven Tages (CT 30) etwa 36% der PS II-Komplexe als PS II_α vor, in der Mitte der subjektiven Nacht (CT 42) sind es nur ca. 23% (Tab. 12). In den LDW-Versuchen ergeben sich für die entsprechenden Zeitpunkte ungefähr 50% bzw. 30% PS II_α-Zentren. Aus einem Vergleich der Anteile der PS II-Formen in den Tag- und Nachtphasen wird deutlich, daß zwischen 13% (Rhythmusversuche) und 23% (LDW-Versuche) der PS II_α-Zentren in PS II_β-Zentren umgewandelt werden.

Während der Tag- bzw. Lichtphase liegen gegenüber der Nacht- bzw. Dunkelfase vermehrt PS II_α-Komplexe vor. Die Pigmentzusammensetzung der PPC für diese Phase maximaler Photosynthesekapazität deutet auf eine Ankopplung der PS II-Komplexe mit geringerer Antennengröße (PPC V) an die PPC III+IV, was zu PS II-Komplexen mit größerem Absorptionsquerschnitt führt. Während der subjektiven Nachtphase bzw. Dunkelfase liegt ein größerer Teil der PPC V entkoppelt von den PPC III+IV vor. Die fluorimetrischen Messungen zeigen, daß der PS II_β-Anteil in dieser Phase minimaler Photosynthesekapazität gegenüber der Tagphase erhöht ist.

Die Vermutung, daß die PS II_α-Charakteristik zu einem großen Teil auf die Ankopplung von Antennen zurückgeführt werden kann, wird durch eine Reihe von Beobachtungen unterstützt. So führt Phosphorylierung des LHC II höherer Pflanzen und Grünalgen, wodurch einige LHC II von den PS II abgekoppelt werden, zu einem gegenüber der PS II_β-Kinetik verringerten Anteil der PS II_α-Kinetik. PS II_β-Charakteristik dominiert die Induktionskinetik in Chl *b*-freien Gersten-Mutanten, die kein LHC II enthalten (PERCIVAL

et al. 1984), und in Bündelscheidenchloroplasten aus Mais, die ebenfalls nahezu kein LHC II enthalten (GHIRARDI & MELIS 1983). Nach Entfernung von Kationen, was ebenfalls zu einer Abkopplung des LHC II vom PS II führt, konnten ausschließlich Effekte auf die PS II_α-Kinetik beobachtet werden (MELIS & OW 1982).

Veränderungen der Organisation der Antennen des PS II wurden entweder als PS II-Heterogenität oder als 'State-Transitions' und damit verbundene Umverteilungen des Energietransfers zwischen PS II und PS I auch in Rotalgen (LEY & BUTLER 1980, SATOH & FORK 1983), Cryptomonaden (SNYDER & BIGGINS 1987) und Diatomeen (OWENS 1986a, 1986b) nachgewiesen. Diese Organismen besitzen, wie aus der Beschreibung ihrer Antennenkomplexe im letzten Abschnitt (4.1.2) deutlich wurde, kein LHC II. Die PS II-Heterogenität in der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* konnte auf unterschiedliche Antennengrößen der PS II_α und PS II_β, d.h., auf unterschiedliche Assoziation der PS II mit Chl *a/c*-Fucoxanthin-Komplexen, zurückgeführt werden (OWENS 1986b).

Untersuchungen zur PS II-Heterogenität haben daneben in höheren Pflanzen und Grünalgen mit einer Reihe von experimentellen Techniken (vergl. BLACK et al. 1986) zur Charakterisierung von verschiedenen PS II-Populationen geführt. So wurden neben PS II_α und PS II_β Formen des PS II gefunden, die sich hinsichtlich des Redoxpotentials des primären Akzeptors Q (Q_H, Q_L bzw. Q₁, Q₂) (MELIS 1978, HORTON & CROZE 1979, JOLIOT & JOLIOT 1979) und der Fähigkeit den sekundären Chinon-Akzeptor Q_B zu reduzieren ('B-type', 'non-B-type'), unterscheiden (BLACK et al. 1986).

Die Analyse der Kinetik der Chl *a*-Fluoreszenzemission bei Anwesenheit von DCMU ergab zwei Phasen, die zwei PS II-Formen zugeschrieben werden: PS II_α und PS II_β, die sich ebenfalls im Redoxpotential ihres primären Chinon-Akzeptors unterscheiden (MELIS & HOMANN 1975, 1976). PS II_α soll Q_H (= Q₁) und ein funktionierendes Q_B ('B-type') binden, PS II_β soll der Q_L (= Q₂) bzw. 'non-B-type'-Form des Photosystem II entsprechen (BLACK et al. 1986, BAKER & WEBBER 1987). Dennoch gibt es zur Zeit kein Modell, in dem alle PS II-spezifischen Charakteristika Q_H und Q_L, Q₁ und Q₂, 'B-type' und 'non-B-type', PS II_α und PS II_β befriedigend erklärt werden können (vergl. HODGES & BARBER 1986).

Die physiologische Bedeutung der PS II-Heterogenität ist zur Zeit noch unklar. Die Abkopplung von Antennenkomplexen vom

PS II_α wird einerseits als Schutzmechanismus diskutiert, der eine Photodestruktion des PS II-Reaktionszentrums verhindern soll (BAKER & WEBBER 1987). Andererseits soll PS II_β Vorstufe des PS II_α sein (MELIS 1985), oder beschädigte PS II-Zentren darstellen (BLACK et al. 1986).

Es gibt ferner eine Reihe von Hinweisen, daß eine Optimierung der Photosynthese durch eine Veränderung der relativen Stöchiometrien der Pigment-Protein-Komplexe erreicht werden kann. Eine Regulierung des Einfangs der Lichtenergie der PS II-Komplexe in höheren Pflanzen kann durch Modifikation des LHC II/PS II-Verhältnisses erfolgen. Das scheint für das PS I nicht der Fall zu sein. Durch eine solche Veränderung der Organisation der Pigment-Proteine des PS II kann der photosynthetische Elektronentransport beeinflußt werden (BAKER & WEBBER 1987). Das Konzept der Veränderung der Stöchiometrien der PPC als Antwort auf Umgebungsparameter und Stoffwechselbedürfnisse ist generell akzeptiert. Mit der vorliegenden Arbeit kommt der Veränderung des PS II_α/PS II_β-Verhältnisses eine wesentliche Rolle bei der circadianen Photosyntheserhythmik zu.

Die Ergebnisse der fluorimetrischen Untersuchungen und die Analyse der Pigmentzusammensetzung der Pigment-Protein-Komplexe machen eine circadiane Veränderung der Organisation der Komplexe innerhalb des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax* deutlich, so daß im folgenden Diskussionsteil die Wechselwirkungen zwischen Pigment-Protein-Komplexen und die möglichen Mechanismen ihrer Regulation im Vordergrund stehen.

Die Vorgänge der An- und Abkopplung von Antennen des PS II und damit Grundlagen der Umverteilung von Excitationsenergie zwischen den beiden Photosystemen sind in den letzten Jahren in höheren Pflanzen und Grünalgen intensiv untersucht worden.

Obwohl die Fluidität der Thylakoidmembran aufgrund der Lipidzusammensetzung groß genug ist, um eine freie Beweglichkeit der PPC und Elektronentransportkomponenten zuzulassen (BARBER 1983), verdeutlicht die Organisation der Komponenten in der Membran einen hohen Grad der Spezifität der Wechselwirkungen zwischen den Komplexen. Es sind elektrostatische und elektrodynamische Kräfte, die die Hauptrolle bei der Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in der Thylakoidmembran und bei den dynamischen Veränderungen ihrer Interaktionen spielen (BARBER 1980, 1982, BAKER & MARKWELL 1985).

Die äußere Oberfläche der Thylakoidmembranen höherer Pflanzen hat einen pI-Wert von 4.3 (NAKATANI et al. 1978), für die einzelnen PPC wurden pI-Werte zwischen 4 und 5 ermittelt (SIEFERMANN-HARMS & NINNEMANN 1979), so daß die PPC unter physiologischen Bedingungen negativ geladen sind. Die negativen Ladungen verursachen eine Konzentrierung von Kationen an der Membranoberfläche. Die Konzentration von Ionen und die Ionenzusammensetzung der wäßrigen Phase bestimmen, wie effektiv die negativen Oberflächenladungen abgeschirmt werden können (BARBER 1980, 1982). Eine Veränderung der Wechselwirkungen zwischen den Komplexen ergibt sich einerseits durch einen Wechsel der elektrischen Eigenschaften der Komplexe. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die Phosphorylierung oberflächenexponierter Aminosäurereste des LHC II, die die negative Oberflächenladung des Komplexes erhöht (BENNETT 1979, ALLEN et al. 1981), und zu einer Verringerung des Absorptionsquerschnittes des PS II durch Entkopplung phosphorylierter LHC II vom PS II führt. Diese Phosphorylierungsvorgänge konnten als molekulare Grundlage der sogenannten 'State 1-State 2-Transitions' identifiziert werden (HORTON & BLACK 1980, BENNETT 1984). Andererseits können Veränderungen der Kationenkonzentration in höheren Pflanzen und Grünalgen *in vitro* die Verteilung der Excitationsenergie im Photosyntheseapparat als Folge einer lateralen Umverteilung der Pigment-Protein-Komplexe in der Membran modifizieren und zu Veränderungen der Membranstapelung führen (BAKER & WEBBER 1987).

Aus solchen Untersuchungen von Kationeneffekten auf Thylakoide könnte man schließen, daß Veränderungen der Kationenkonzentrationen im Stroma die Grundlage für 'State-Transitions' *in vivo* sind. Das scheint in einigen Algenklassen der Fall zu sein. In Diatomeen konnten zwei PS II-Typen differenziert werden, die sich hauptsächlich in ihrer Antennengröße unterscheiden (OWENS 1986a). Der Autor nimmt an, daß die Energieverteilung zwischen den Photosystemen I und II über eine Kontrolle des Energietransfers von den Antennenkomplexen zum PS II reguliert wird. Diese Kontrolle soll durch Ionen erfolgen, unabhängig vom Redoxzustand des Plastochinon-Pools (OWENS 1986b). CATT et al. (1984) identifizierten in der Grünalge *Chlorella* neben den 'State 1-State 2-Transitions' einen durch Dunkel-Licht-Wechsel verursachten Mechanismus der Energieumverteilung. Der Übergang von der Dunkel- in die Lichtphase ist verantwortlich für Veränderungen der lokalen Ionenum-

gebung der Thylakoidmembran. Derartige Ionenumverteilungen nehmen CATT et al. (1984) als Ursache dieses zweiten Kontrollmechanismus zur Verteilung der Excitonen in Photosyntheseapparat von Grünalgen an. Möglicherweise steht dieser ionenregulierte Mechanismus in Zusammenhang mit zellzyklusabhängigen 'State-Transitions' von Grünalgen, die im Licht-Dunkel-Wechsel synchronisiert wurden (BUTKO 1984, WINTER & BRANDT 1986).

Ob Ionen, insbesondere Kationen, in *Gonyaulax* Einfluß auf die An- und Abkopplung von Antennenkomplexen des PS II nehmen, und damit eine regulatorische Rolle in der circadianen Photosyntheserhythmik haben, kann an dieser Stelle nur vermutet werden. Der K^+ -Transport aus dem Chloroplasten konnte in unmittelbarem Zusammenhang mit der Chloroplastenschumpfung und Wasserverlust des Chloroplasten im Licht gesehen werden (MURAKAMI et al. 1975). BOCZAR & PREZELIN (1986) fanden nach $MgCl_2$ -Zugabe während der Thylakoidmembranpräparation aus dem Dinoflagellaten *Glenopodium* sp. eine Veränderung der Verteilung von Chl a zwischen den PPC aus diesem Dinoflagellaten. Untersuchungen von LONERGAN (1986) zeigten, daß eine Inhibierung des Ca^{2+} -bindenden Calmodulin die photosynthetischen Reaktionen von der inneren Uhr abkoppelt.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gesagt werden, daß die rhythmischen Veränderungen der Photosynthesekapazität mit Veränderungen der Organisation der Pigment-Protein-Komplexe in *Gonyaulax* in Zusammenhang stehen. Während der subjektiven Tagphase liegen gegenüber der Nachtphase vermehrt PS II-Komplexe mit größerem Absorptionsquerschnitt vor. Veränderungen der Stöchiometrie von PS II $_{\alpha}$ und PS II $_{\beta}$ bei Anstieg des PS II $_{\alpha}$ /PS II $_{\beta}$ -Verhältnisses führen auf der Ebene der Thylakoidmembran zu einer Regulierung des Transfers von Excitationsenergie, um einen Verlust an Photosynthesekapazität zu vermeiden. Auf diesem Wege erfolgt möglicherweise die Anpassung des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax* an periodische Veränderungen des Tag-Nacht-Wechsels.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Klärung der molekularen Vorgänge bei der circadianen Photosyntheserhythmik des marinen Dinoflagellaten *Gonyaulax polyedra* durchgeführt.

Zunächst wurden mit Hilfe einer optimierten Deriphat-PAGE solubilisierte Thylakoidmembranen aus *Gonyaulax* in fünf Pigment-Protein-Komplexe aufgetrennt, die als PPC I-PPC V bezeichnet wurden.

Um eine Zuordnung der PPC aus *Gonyaulax* zum PS I, zum PS II und Antennenkomplexen zu erleichtern, wurden Thylakoidmembranen, PS I-Komplexe (PS I-200) und PS II-Komplexe (BBY-Partikel) aus Spinat im gleichen elektrophoretischen System aufgetrennt.

Die Pigment-Protein-Komplexe wurden hinsichtlich ihrer spektralen Eigenschaften, ihrer Pigment- und Polypeptidzusammensetzung charakterisiert. Dazu wurde ein reversed-phase HPLC-System zur Auftrennung und Quantifizierung der Chlorophylle und Carotinoide aus *Gonyaulax* entwickelt.

Die beiden Komplexe PPC I und II können als PS I-Komplexe identifiziert werden. Sie haben eine nahezu identische Pigmentzusammensetzung, sind im Vergleich zu Thylakoidmembranen mit β -Carotin angereichert, und binden nur halb so viele Xanthophylle. Diadinoxanthin ist das mengenmäßig am stärksten vertretene Xanthophyll in diesen Komplexen und Bestandteil einer PS I-spezifischen Antenne. PPC III ist gegenüber Thylakoidmembranen mit Peridinin und Chl c_2 angereichert und stellt ein PS II-bindendes Pigment-Protein komplexer Struktur dar. PPC IV ist ein im Vergleich mit Thylakoidmembran mit Xanthophyllen, insbesondere Peridinin, angereicherter Komplex, der kein β -Carotin enthält. Er kann als Chl a/c_2 -Peridinin-Antennenkomplex betrachtet werden. PPC V ist ein PS II-Komplex, der gegenüber Thylakoidmembranen mit β -Carotin angereichert ist, jedoch sind im Gegensatz zum PPC III weniger Antennenpigmente assoziiert.

Das wasserlösliche Peridinin-Chl a -Protein bindet ausschließlich Peridinin und Chl a im Verhältnis von $\sim 4/1$ an Polypeptide von 32 kDa.

Mit den ermittelten Pigment- und Polypeptiddaten der PPC aus *Gonyaulax* wird ein Modell zur Organisation der Komplexe in und an der Thylakoidmembran vorgeschlagen.

Die aus der Charakterisierung der Pigment-Protein-Komplexe gewonnenen Kenntnisse über die molekulare Architektur des Photosyntheseapparates von *Gonyaulax* waren Grundlage für die Analyse der circadianen Photosyntheserhythmik. Deren Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Photosynthesekapazität ganzer Zellen, gemessen als Sauerstoffentwicklung, zeigt unter konstanten Lichtbedingungen einen rhythmischen Verlauf. Das Maximum der Kapazität liegt in der Mitte der subjektiven Tagphase, während das Minimum in der Mitte der subjektiven Nachtphase liegt. In Versuchen, in denen die Zellen weiterhin im Licht-Dunkel-Wechsel kultiviert wurden, liegt das Maximum der Sauerstoffentwicklung in der Mitte der Lichtphase, das Minimum in der Mitte der Dunkelphase.

Die Ergebnisse der Untersuchungen des lichtinduzierten Elektronentransportes über beide Photosysteme, über das PS I, über das PS II, sowie über das PS I mit Einbeziehung des Plastochinon-Pools lassen in Rhythmus- und LDW-Versuchen keine Veränderungen erkennen.

Der Chlorophyll- und Carotinoidgehalt und das Pigmentmuster ganzer Zellen von *Gonyaulax* ist über den Zeitraum der Rhythmus- und LDW-Versuche konstant.

Auch in Thylakoidmembranen bleibt das Pigmentmuster für die Zeitpunkte maximaler und minimaler Photosynthesekapazität der Rhythmus- und LDW-Versuche konstant. Mittels Deriphat-PAGE können für diese Zeitpunkte jeweils fünf PPC aufgetrennt werden, wobei das Pigmentmuster und der Anteil der nach Elektrophorese auftretenden freien Pigmente unverändert sind.

Demgegenüber können für einzelne PPC Veränderungen der Pigmentzusammensetzung nachgewiesen werden. Während der Rhythmusversuche ist das Xan/Chl *a*-Verhältnis der PPC III+IV und des PPC V in der subjektiven Nachtphase gegenüber der Tagphase erhöht. In den LDW-Versuchen können entsprechende Angaben ebenfalls für PPC III+IV sowie PPC I+II gemacht werden. Die Veränderung des Pigmentmusters der PPC III+IV ist im Zusammenhang mit einer komplexen Organisation des PS II-Antennensystems zu sehen, und kann nicht auf einen unterschiedlichen Grad der Inkorporation von wasserlöslichen Peridinin-Chl *a*-Proteinen in die Membran zurückgeführt werden.

Fluoreszenzinduktionsmessungen an dunkeladaptierten, mit DCMU behandelten *Gonyaulax*-Zellen zeigen, daß zwei PS II-Formen vorliegen, die sich vermutlich in ihrer Antennengröße unterscheiden. Zum Zeitpunkt maximaler Photosynthesekapazität liegen während der Rhythmus- und LDW-Versuche vermehrt PS II_α-Komplexe vor, die gegenüber PS II_β mit einer größeren Anzahl von Antennenpigmenten ausgestattet sind. Folglich ist während der Tag- bzw. Lichtphase jeweils ein größerer Teil der PS II-Komplexe (PPC V) mit den PPC III+IV assoziiert, so daß sich ein PS II-Protein mit größerem Absorptionsquerschnitt ergibt. In der Nachtphase bzw. Dunkelphase ist der PS II_β-Anteil demgegenüber erhöht, es liegt ein größerer Teil der PPC V entkoppelt vom PPC III+IV vor.

Es ist festzustellen, daß der Veränderung des Verhältnisses von PS II_α zu PS II_β und die dem zugrundeliegende Veränderung der Organisation der Pigment-Protein-Komplexe des PS II eine wesentliche Rolle bei der circadianen Photosyntheserhythmik in *Gonyaulax polyedra* zukommt.

Summary

This work concerns the molecular events involving in the circadian photosynthetic rhythmicity of the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*.

Initially, SDS-solubilized thylakoid membranes of *Gonyaulax* were separated into five pigment-protein-complexes by applying an optimized Deriphat-PAGE. The complexes were designated as PPC I, PPC II, PPC III, PPC IV and PPC V.

To allow classification of the PPC from *Gonyaulax* in PS I-, PS II-, and antenna-complexes, the solubilized thylakoid membranes, PS I- (PS I-200) and PS II-complexes (BBY-membranes) from spinach were electrophorized in the same way.

The PPC were characterized according to their absorption spectra, their pigment- and polypeptide composition. For the separation and quantification of the chlorophylls and carotenoids of *Gonyaulax*, a reversed-phase HPLC-system was developed.

The characteristics of the two complexes PPC I and II leads to the conclusion that they may represent PS I-complexes. The complexes show identical pigment-compositions, and, compared to thylakoid membranes, are enriched in β-carotene, and bind only half as much xanthophylls. A significant quantity of diadinoxanthin

is found associated with these complexes, and is part of a PS I-specific antenna. PPC III is enriched in peridinin and Chl c_2 compared to thylakoid membranes. It represents a PS II-containing pigment-protein of complex structure. PPC IV is, in comparison to thylakoid membranes, enriched in xanthophylls, particularly peridinin, and contains no β -carotene. This pigment-protein is identified as a Chl a/c_2 -peridinin-antenna complex. PPC V is identified as a PS II-complex, and, compared to thylakoid membranes, is enriched in β -carotene; but, in comparison with PPC III, is associated with lower amounts of antenna pigments.

The water-soluble peridinin-Chl a -protein binds exclusively peridinin and Chl a in a ratio 4/1 to polypeptides of 32 kDa.

A model for the organization of these complexes in and at the thylakoid membrane is proposed, based on the pigment- and polypeptide composition and the distribution of Chl a between the PPC of *Gonyaulax*.

The characterization of the molecular architecture of the photosynthetic apparatus from *Gonyaulax* was a prerequisite for the analysis of the photosynthetic rhythmicity. The results can be summarized as follows.

The photosynthetic capacity of intact cells, measured as O_2 -evolution, shows circadian periodicity under continuous light. The maximal capacity is seen in the middle of the subjective day, whereas the minimal capacity is in the middle of the subjective night. In the light-dark-cycle experiments the maximum appears in the middle of the light-phase, the minimum in the middle of the dark-phase.

The rate of electron flow through both photosystems, PS I-, PS II-activity, and PS I-activity including the PQ-pool show no rhythmicity.

The chlorophyll- and carotenoid-content and the pigment pattern of whole cells from *Gonyaulax* is shown to be constant during the continuous light- and LD-experiments

Likewise, the pigment pattern of the thylakoid membranes is not different at times of maximal and minimal photosynthetic capacity. Five PPC can be separated at each time period with Deriphat-PAGE, and neither changes in the pigment pattern nor the amount of free pigments after electrophoresis are observed.

In contrast, the pigment pattern of particular PPC do change. In the experiments under continuous light, the Xan/Chl *a*-ratio of the PPC III+IV and PPC V is significantly higher during the subjective night compared to the subjective day. Similar results are obtained in the LD-experiments for the PPC III+IV and PPC I+II. The changes in the pigment pattern of the PPC III+IV may be seen in relation to the complex organization of the PS II-antenna system and do not depend on different degree of incorporation of the water-soluble peridinin-Chl *a*-protein into the thylakoid membrane.

Measurements of fluorescence induction of dark-adapted, DCMU-treated *Gonyaulax* cells show that two PS II-forms can be differentiated, which differ primarily in antenna size. At the time of maximal photosynthetic capacity, an increased proportion of the PS II_α-complexes exist, which, compared to PS II_β, are associated with more antenna pigments. During the day- and light-phase, an increased amount of the PS II-complexes (PPC V) is associated with PPC III+IV, resulting in a PS II-protein with a greater absorption cross section. In the night- and dark-phase the PS II_β-portion is increased in comparison to the day-phase, a greater amount of PPC V is uncoupled from PPC III+IV.

These changes in stoichiometries between PS II_α and PS II_β and of the organization of the pigment-protein-complexes play an essential role in the photosynthetic rhythmicity of *Gonyaulax polyedra*.

6. Literatur

- Alberte RS & JP Thornber (1978): A rapid procedure for isolating the photosystem I reaction center in a highly enriched form. *FEBS Lett* 91, 126-130.
- Alberte RS, AL Friedman, DL Gustafson, MS Rudnik & H Lyman (1981): Light-harvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll *a/c* and chlorophyll *a*/fucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochim Biophys Acta* 635, 304-316.
- Allen JF, J Bennett, KE Steinback & CJ Arntzen (1981): Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature* 291, 25-29.
- Anderson JM, JC Waldron & SW Thorne (1978): Chlorophyll-protein complexes of spinach and barley thylakoids. *FEBS Lett* 92, 227-233.
- Anderson JM & J Barrett (1979): Chlorophyll-protein complexes of brown algae: P700 reaction centre and light-harvesting complexes. In: *Chlorophyll Organization and Energy Transfer in Photosynthesis* (Ciba Foundation Symp 61) pp 81-104, Excerpta Medica, Amsterdam.
- Anderson JM, JS Brown, E Lam & R Malkin (1983): Chlorophyll *b*: An integral component of photosystem I of higher plant chloroplasts. *Photochem Photobiol* 38, 205-210.
- Anderson JM & A Melis (1983): Localization of different photosystems in separate regions of chloroplast membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 80, 745-749.
- Anderson JM & J Barrett (1986): Light-harvesting complexes of algae. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 19 (New Series) *Photosynthesis III* (LA Staehelin & CJ Arntzen, eds) pp 269-285, Springer, Berlin.
- Baker NR & JP Markwell (1985): Pigment-protein complexes and their interactions. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment* (J Barber & NR Baker, eds) pp 49-90, Elsevier, Amsterdam.
- Baker NR & AN Webber (1987): Interactions between photosystems. *Adv Bot Res* 13, 1-66.
- Barber J (1980): Membrane surface charges and potentials in relation to photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 594, 253-308.
- Barber J (1982): Influence of surface charges on thylakoid structure and function. *Annu Rev Plant Physiol* 33, 261-295.
- Barber J (1983): Photosynthetic electron transport in relation to thylakoid membrane composition and organization. *Plant Cell Environ* 6, 311-322.
- Barber J (1985): Thylakoid membrane structure and organization of electron transport components. In: *Photosynthetic Mechanisms and the Environment* (J Barber & NR Baker, eds) pp 92-134, Elsevier, Amsterdam.
- Barrett J & JM Anderson (1977): Thylakoid membrane fragments with different chlorophyll *a*, chlorophyll *c* and fucoxanthin compositions isolated from the brown seaweed *Ecklonia radiata*. *Plant Sci Lett* 9, 275-283.

- Barrett J & JM Anderson (1980): The P700-chlorophyll *a*-protein complex and two major light-harvesting complexes of *Acrocarpia paniculata* and other seaweeds. *Biochim Biophys Acta* 590, 309-323.
- Bassi R, G Høyer-Hansen, R Barbato, G.M. Giacometti & DJ Simpson (1987): Chlorophyll-proteins of the photosystem II antenna system. *J Biol Chem* 262, 13333-13341.
- Bassi R & DJ Simpson (1987): Chlorophyll-protein complexes of barley photosystem I. *Eur J Biochem* 163, 221-230.
- Bengis C & N Nelson (1975): Purification and properties of the photosystem I reaction center from chloroplasts. *J Biol Chem* 250, 2783-2788.
- Bengis C & N Nelson (1977): Subunit structure of chloroplast photosystem I reaction center. *J Biol Chem* 252, 4564-4569.
- Bennett J (1979): Chloroplast phosphoproteins. Phosphorylation of polypeptides of the light-harvesting chlorophyll protein complex. *Eur J Biochem* 99, 133-137.
- Bennett J (1983): Regulation of photosynthesis by reversible phosphorylation of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein. *Biochem J* 212, 1-13.
- Bennett J (1984): Chloroplast protein phosphorylation and the regulation of photosynthesis. *Physiol Plant* 60, 583-590.
- Berthold DA, GT Babcock & CF Yocum (1981): A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. EPR and electron transport properties. *FEBS Lett* 134, 231-234.
- Black MT, TH Brearley & P Horton (1986): Heterogeneity in chloroplast photosystem II. *Photosynth Res* 8, 193-207.
- Boczar BA, BB Prezelin, J Markwell & JP Thornber (1980): A chlorophyll *c*-containing pigment-protein complex from the marine dinoflagellate *Glenopodium* sp. *FEBS Lett* 120, 243-247.
- Boczar BA & BB Prezelin (1986): Light and $MgCl_2$ -dependent characteristics of four chlorophyll-protein complexes isolated from the marine dinoflagellate, *Glenopodium* sp. *Biochim Biophys Acta* 850, 300-309.
- Boczar BA & BB Prezelin (1987): Chlorophyll-protein complexes from the red-tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra* Stein. Isolation, characterization, and the effect of growth irradiance on chlorophyll distribution. *Plant Physiol.* 83, 805-812.
- Bose S & P Ramanujam (1984): Heterogeneity in photosystem I. Evidence from cation-induced decrease in photosystem I electron transport. *Biochim Biophys Acta* 764, 40-45.
- Braumann T, G Weber & LH Grimme (1982): Carotenoid and chlorophyll composition of light-harvesting and reaction centre proteins of the thylakoid membrane. *Photobiochem Photobiophys* 4, 1-8.
- Butko P (1984): Changes in photosynthetic apparatus and excitation energy distribution in *Chlorella* during the life cycle. *Photobiochem Photobiophys* 8, 63-72.
- Camm EL & BR Green (1980): Fractionation of thylakoid membranes with the nonionic detergent octyl- β -D-glucopyranoside. Resolution of chlorophyll-protein complex II into two chlorophyll-protein complexes. *Plant Physiol* 66, 428-432.

- Caron L, JP Dubacq, C Berkaloff & H Jupin (1985): Subchloroplast fractions from the brown algae *Fucus serratus*; phosphatidylglycerol contents. *Plant Cell Physiol* 26, 131-139.
- Caron L & J Brown (1987): Chlorophyll-carotenoid protein complexes from the diatom, *Phaeodactylum tricornutum*: spectrophotometric, pigment and polypeptide analyses. *Plant Cell Physiol* 28, 775-785.
- Catt M, K Saito & WP Williams (1984): Excitation-energy distribution in green algae. The existence of two independent light-driven control mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 767, 39-47.
- Cornelius G, A Schroeder-Lorenz & L Rensing (1985): Circadian-clock control of protein synthesis and degradation in *Gonyaulax polyedra*. *Planta* 166, 365-370.
- Cunningham FX & JA Schiff (1986): Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll *b*. I. Pigment composition. *Plant Physiol* 80, 223-230.
- Damm I (1987): Zur Lokalisation und Funktion der Carotinoide und Chlorophylle in Untereinheiten der Photosynthesemembran. Dissertation, Universität Bremen.
- Demmig B, K Winter, A Krüger & F-C Czygan (1987): Photoinhibition and zeaxanthin formation in intact leaves. *Plant Physiol* 84, 218-224.
- Demmig B, K Winter, A Krüger & F-C Czygan (1988): Zeaxanthin and the heat dissipation of excess light energy in *Nerium oleander* exposed to a combination of high light and water stress. *Plant Physiol* 87, 17-24.
- Donner B & L Rensing (1984): Circadian control of chromosome unwinding and mitochondrial division in *Gonyaulax polyedra*. *Eur J Cell Biol* 35, 143-145.
- Dunahay TG, LA Staehelin, M Seibert, PD Ogilvie & SP Berg (1984): Structural, biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach. *Biochim Biophys Acta* 764, 179-193.
- Durand M & C Berkaloff (1985): Pigment composition and chloroplast organization of *Gambierdiscus toxicus* Adachi & Fukuyo (Dinophyceae). *Phycologia* 24, 217-223.
- Dwarte DM & M Vesik (1982): Freeze-fracture thylakoid ultrastructure of representative members of 'chlorophyll *c*' algae. *Micron* 13, 325-326.
- Edmunds LN (1984): Physiology of circadian rhythms in micro-organisms. *Advances in Microbial Physiology* 25, 63-148.
- Eskins K, ME Duysen & L Olson (1983): Pigment analysis of chloroplast pigment-protein complexes in wheat. *Plant Physiol* 71, 777-779.
- Foppen FH (1971): Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatogr Rev* 14, 133-298.
- Friedman AL & RS Alberty (1984): A diatom light-harvesting pigment-protein complex. Purification and characterization. *Plant Physiol* 76, 483-489.
- Friedman AL & RS Alberty (1986): Biogenesis and light regulation of the major light harvesting chlorophyll-protein of diatoms. *Plant Physiol* 80, 43-51.

- Ghirardi ML & A Melis (1983): Localization of photosynthetic electron transport components in mesophyll and bundle sheath chloroplasts of *Zea mays*. Arch Biochem Biophys 224, 19-28.
- Goto K, DL Laval-Martin & LN Edmunds (1985): Biochemical modeling of an autonomously oscillatory circadian clock in *Euglena*. Science 228, 1284-1288.
- Govindjee O, D Wong, BB Prezelin & BM Sweeney (1979): Chlorophyll a fluorescence of *Gonyaulax polyedra* grown on a light-dark cycle after transfer to constant light. Photochem Photobiol 30, 405-411.
- Grimme LH (1974): Die Carotinoid-Zusammensetzung von PS I und PS II *Chlorella*-Subchloroplastpartikeln. Ber Deutsch Bot Ges 87, 509-514.
- Gugliemelli LA (1984): Isolation and characterization of pigment-protein particles from the light-harvesting complex of *Phaeodactylum tricornutum*. Biochim Biophys Acta 766, 45-50.
- Gugliemelli LA, HJ Dutton, PA Jursinic & HW Siegelman (1981): Energy transfer in a light-harvesting carotenoid-chlorophyll c-chlorophyll a-protein of *Phaeodactylum tricornutum*. Photochem Photobiol 33, 903-907.
- Gullard RRL & JH Ryther (1962): Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula conferraceae* (Cleve) Gran. Can J Microbiol 8, 229-239.
- Hastings JW & BM Sweeney (1957): The luminescent reaction in extracts of the marine dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. J Cell Comp Physiol 49, 209-226.
- Hastings JW, L Astrachan & BM Sweeney (1961): A persistent daily rhythm in photosynthesis. J Gen Physiol 45, 67-76.
- Haworth P, JL Watson & CJ Arntzen (1983): The detection, isolation and characterization of a light harvesting complex which is specifically associated with photosystem I. Biochim Biophys Acta 724, 151-158.
- Haxo FT, JH Kycia, GF Somers, A. Bennett & HW Siegelman (1976): Peridinin-chlorophyll a proteins of the dinoflagellate *Amphidinium carterae* (Plymouth 450). Plant Physiol 57, 297-303.
- Herman EM & BM Sweeney (1975): Circadian rhythm of chloroplast ultrastructure in *Gonyaulax polyedra*, concentric organization around a central cluster of ribosomes. J Ultrastructure Res 50, 347-354.
- Hodges M & J Barber (1986): Analysis of chlorophyll fluorescence induction kinetics exhibited by DCMU-inhibited thylakoids and the origin of α and β centres. Biochim Biophys Acta 848, 239-246.
- Holdsworth ES & JH Arshad (1977): A manganese-copper-pigment-protein complex isolated from the photosystem II of *Phaeodactylum tricornutum*. Arch Biochem Biophys 183, 361-373.
- Horton P & E Croze (1979): Characterization of two quenchers of chlorophyll fluorescence with different midpoint oxidation-reduction potentials in chloroplasts. Biochim Biophys Acta 545, 188-201.
- Horton P & MT Black (1980): Activation of adenosine 5'-triphosphate induced quenching of chlorophyll fluorescence by reduced plastoquinone. The basis of State I-State II transitions in chloroplasts. FEBS Lett 119, 141-144.

- Huchzermeyer B, A Loehr & I Willms (1986): A direct interaction between photosystem I and the chloroplast coupling factor. *Biochem J* 234, 217-220.
- Ikegami I & S Itoh (1987): Chlorophyll organization in photosystem-I reaction-center of spinach chloroplasts. In: *Progress in Photosynthesis Research*, Vol 1 (J Biggins, ed) pp 265-268, Nijhoff, Dordrecht.
- Ingram K & RG Hiller (1983): Isolation and characterization of a major chlorophyll *a/c*₂ light-harvesting protein from a *Chroomonas* species (Cryptophyceae). *Biochim Biophys Acta* 722, 310-319.
- Ish-Shalom D & I Ohad (1983): Organization of chlorophyll-protein complexes of photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 722, 498-507.
- Izawa S & RL Pan (1978): Photosystem I electron transport and phosphorylation supported by electron donation to the plastquinone region. *Biochem Biophys Res Commun* 83, 1171-1177.
- Jeffrey SW (1968): Quantitative thin-layer chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine algae. *Biochim Biophys Acta* 162, 271-285.
- Jeffrey SW (1972): Preparations and some properties of crystalline chlorophyll *c*₁ and *c*₂ from marine algae. *Biochim Biophys Acta* 279, 15-33.
- Jeffrey SW & GF Humphrey (1975): New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*₁ and *c*₂ in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen* 167, 191-194.
- Jeffrey SW, M Sielicki & FT Haxo (1975): Chloroplast pigment pattern in dinoflagellates. *J Phycol* 11, 374-384.
- Johansen JE, WA Svec, S Liaaen-Jensen & FT Haxo (1974): Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochemistry* 13, 2261-2271.
- Joliot P & A Joliot (1979): Comparative study of the fluorescence yield and of the C550 absorption change at room temperature. *Biochim Biophys Acta* 546, 93-105.
- Knoetzel J, I Damm & L Rensing (1987): Pigment composition of pigment-protein complexes from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. In: *Progress of Photosynthesis Research*, Vol 2 (J Biggins, ed) pp 137-140, Nijhoff, Dordrecht.
- Knoetzel J, T Braumann & LH Grimme (1988): Pigment-protein complexes of green algae: improved methodological steps for the quantification of pigments in pigment-protein complexes derived from the green algae *Chlorella* and *Chlamydomonas*. *J Photochem Photobiol B Biol* 1, 475-491.
- Koka P & P-S Song (1977): The chromatophore topography and binding environment of peridinin-chlorophyll *a*-protein complexes from marine dinoflagellate algae. *Biochim Biophys Acta* 495, 220-231.
- Lam E & R Malkin (1983): Characterization of electron transfer from water to plastocyanin catalyzed by resolved electron transfer complexes from chloroplasts. *Arch Biochem Biophys* 224, 456-463.
- Lam E, W Ortiz & R Malkin (1984a): Chlorophyll *a/b* proteins of photosystem I. *FEBS Lett* 168, 10-14.

- Lam E, W Ortiz, S Mayfield & R Malkin (1984b): Isolation and characterization of a light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex associated with photosystem I. *Plant Physiol* 74, 650-655.
- Larkum AWD & J Barrett (1983): Light-harvesting processes in algae. *Adv Bot Res* 10, 3-219.
- Ley AC & WL Butler (1980): Energy distribution in the photochemical apparatus of *Porphyridium cruentum* in State I and State II. *Biochim Biophys Acta* 592, 349-363.
- Lichtle C, JC Duval & Y Lemoine (1987): Comparative biochemical, functional and ultrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophyceae: *Cryptomonas rufescens*; isolation of an active phycoerythrin particle. *Biochim Biophys Acta* 894, 76-90.
- Loeblich AR III & VE Smith (1968): Chloroplast pigments of the marine dinoflagellate *Gyrodinium respiciens*. *Lipids* 3, 5-13.
- Lonergan TA (1981): A circadian rhythm in the rate of light-induced electron flow in three leguminous species. *Plant Physiol* 68, 1041-1046.
- Lonergan TA (1984): Regulation of the photosynthetic light reactions by the biological clock. *Photochem Photobiol* 40, 789-793.
- Lonergan TA (1986): A possible second role for calmodulin in biological clock-controlled processes of *Euglena*. *Plant Physiol* 82, 226-229.
- Lonergan TA & ML Sargent (1978): Regulation of the photosynthesis rhythm in *Euglena gracilis*. I. Carbonic anhydrase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase do not regulate the photosynthesis rhythm. *Plant Physiol* 61, 150-153.
- Lonergan TA & ML Sargent (1979): Regulation of the photosynthesis rhythm in *Euglena gracilis*. II. Involvement of electron flow through both photosystems. *Plant Physiol* 64, 99-103.
- Machold O (1986): Polypeptide composition of the photosystem I chlorophyll *a/b*-protein from three different plant species. *Carlsberg Res Commun* 51, 227-238.
- Machold O, DJ Simpson & BL Møller (1979): Chlorophyll-proteins of thylakoids from wild-type and mutants of barley (*Hordeum vulgare*). *Carlsberg Res Commun* 44, 235-254.
- Mandelli EF (1968): Carotenoid pigments of the dinoflagellate, *Glenopodium foliaceum* Stein. *J Phycol* 4, 347-348.
- Mantoura RFC & CA Llewellyn (1983): The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 151, 297-314.
- Markwell JP (1986): Electrophoretic analysis of photosynthetic pigment-protein complexes. In: *Photosynthesis: energy transduction: a practical approach* (MF Hipkins & NR Baker, eds) pp 27-49, IRL Press, Oxford.
- Markwell JP, S Reinman & JP Thornber (1978): Chlorophyll-protein complexes from higher plants. A procedure for improved stability and fractionation. *Arch Biochem Biophys* 190, 136-141.

- Markwell JP, JP Thornber & RT Boggs (1979): Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 76, 1233-1235.
- Melis A (1978): Oxidation-reduction potential dependence of the two kinetic components in chloroplast system II primary photochemistry. *FEBS Lett* 95, 202-206.
- Melis A (1985): Functional properties of photosystem II_p in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 808, 334-342.
- Melis A & PH Homann (1975): Kinetic analysis of the fluorescence induction in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea poisoned chloroplasts. *Photochem Photobiol* 21, 431-437.
- Melis A & PH Homann (1976): Heterogeneity of the photochemical centers in system II of chloroplasts. *Photochem Photobiol* 23, 343-350.
- Melis A & G Akoyunoglou (1977): Development of the two heterogeneous photosystem II units in etiolated bean leaves. *Plant Physiol* 59, 1156-1160.
- Melis A & LNM Duysens (1979): Biphasic energy conversion kinetics and absorbance difference spectra of photosystem II of chloroplasts. Evidence for two different photosystem II reaction centers. *Photochem Photobiol* 29, 373-382.
- Melis A & RA Ow (1982): Photoconversion kinetics of chloroplast photosystems I and II. Effect of Mg²⁺. *Biochim Biophys Acta* 682, 1-10.
- Melis A & JM Anderson (1983): Structural and functional organization of the photosystems in spinach chloroplasts. Antenna size, relative electron-transport capacity, and chlorophyll composition. *Biochim Biophys Acta* 724, 473-484.
- Melis A, M Spangfort & B Andersson (1987): Light-absorption and electron-transport balance between photosystem II and photosystem I in spinach chloroplasts. *Photochem Photobiol* 45, 129-136.
- Menger W, J Knötzel, T Braumann & LH Grimme (1984): Function of chlorophylls and carotenoids in thylakoid membranes: pigment composition of LHCP-complexes of spinach and *Chlorella fusca*. In: *Advances in Photosynthesis Research*, Vol II (C Sybesma, ed) pp 145-148, Nijhoff/Junk, The Hague.
- Merchant S & BR Selman (1985): Photosynthetic ATPases: purification, properties, subunit isolation and function. *Photosynth Res* 6, 3-31.
- Mischkind MD, D Mauzerall & SI Beale (1979): Diurnal variation *in situ* of photosynthetic capacity in *Ulva* is caused by a dark reaction. *Plant Physiol* 64, 896-899.
- Møller BL (1985): The photosynthetic membrane. *Biol Skr Dan Vid Selsk* 25, 123-172.
- Mullet JE, JJ Burke & CJ Arntzen (1980): Chlorophyll-proteins of photosystem I. *Plant Physiol* 65, 814-822.
- Murakami S, J Torres-Pereira & L Packer (1975): Structure of the chloroplast membrane-relation to energy coupling and ion transport. In: *Bioenergetics of Photosynthesis* (Govindjee, ed) pp 556-618, Academic Press, New York.
- Murata N & M Miyao (1985): Extrinsic membrane proteins in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *TIBS* 10, 122-124

- Nakatani HY, J Barber & JA Forrester (1978): Surface charges on chloroplast membranes as studied by particle electrophoresis. *Biochim Biophys Acta* 504, 215-225.
- Nanba O & K Satoh (1987): Isolation of a photosystem II reaction center consisting of D-1 and D-2 polypeptides and cytochrome *b*-559. *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 109-112.
- Nechushtai R & N Nelson (1981): Purification properties and biogenesis of *Chlamydomonas reinhardtii* photosystem I reaction center. *J Biol Chem* 256, 11624-11628.
- Nechushtai R, CC Peterson, GF Peter and JP Thornber (1987): Purification and characterization of a light-harvesting chlorophyll *a/b*-protein of photosystem I of *Lemna gibba*. *Eur J Biochem* 164, 345-350.
- Ortiz W, E Lam, M Ghirardi & R Malkin (1984): Antenna function of a chlorophyll *a/b* protein complex of photosystem I. *Biochim Biophys Acta* 766, 505-509.
- Owens TG (1986a): Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol* 80, 739-746.
- Owens TG (1986b): Photosystem II heterogeneity in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photochem Photobiol* 43, 535-544.
- Owens TG & ER Wold (1986): Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiol* 80, 732-738.
- Percival MP, AN Webber & NR Baker (1984): Evidence for the role of the light-harvesting chlorophyll *a/b* protein complex in photosystem II heterogeneity. *Biochim Biophys Acta* 767, 582-589.
- Peyriere M, L Caron & H Jupin (1984): Pigment complexes and energy transfer in brown algae. *Photosynthetica* 18, 184-191.
- Piccioni R, G Bellamare & NH Chua (1982): Methods of polyacrylamide gel electrophoresis in the analysis and preparation of plant polypeptides. In: *Methods in Chloroplast Molecular Biology* (M Edelman, RB Hallick & NH Chua, eds) pp 985-1014, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Prezelin BB (1976): The role of peridinin-chlorophyll *a*-proteins in the photosynthetic light adaptations of the marine dinoflagellate, *Glenopodium* sp. *Planta* 130, 225-233.
- Prezelin BB (1987): Photosynthetic physiology of dinoflagellates. In: *The Biology of dinoflagellates* (FJR Taylor, ed) pp 174-223, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Prezelin BB & FT Haxo (1976): Purification and characterization of peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the marine dinoflagellates *Glenopodium* sp. and *Gonyaulax polyedra*. *Planta* 128, 133-141.
- Prezelin BB, BW Meeson & BM Sweeney (1977): Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates. I. Pigmentation, photosynthetic capacity and respiration. *Plant Physiol* 60, 384-387.
- Prezelin BB & BM Sweeney (1977): Characterization of photosynthetic rhythms in marine dinoflagellates. II. Photosynthesis-irradiance curves and *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence. *Plant Physiol* 60, 388-392.

- Prezelin BB & RS Alberte (1978): Photosynthetic characteristics and organization of chlorophyll in marine dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 1801-1804.
- Prezelin BB & BM Sweeney (1978): Photoadaptation of photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Mar Biol* 48, 27-35.
- Prezelin BB & HA Matlick (1980): Time-course of photoadaptation in the photosynthesis-irradiance relationship in a dinoflagellate exhibiting photosynthetic periodicity. *Mar Biol* 58, 85-96.
- Ramanujam P & S Bose (1983): Correlation between thylakoid stacking and cation-induced decrease in photosystem I electron transport at saturating light intensity. *Arch Biochem Biophys* 221, 238-242.
- Redlinger T & E Gantt (1983): Photosynthetic membranes of *Porphyridium cruentum*. An analysis of chlorophyll-protein complexes and heme-binding proteins. *Plant Physiol* 73, 36-40.
- Rensing L, W Taylor, J Dunlap & JW Hastings (1980): The effects of protein synthesis inhibitors on the *Gonyaulax* clock. II. The effect of cycloheximide on ultrastructural parameters. *J Comp Physiol* 138, 9-18.
- Rhiel E, E Mörschel & W Wehrmeyer (1987): Characterization and structural analysis of a chlorophyll *a/c* light harvesting complex and of photosystem I particles isolated from thylakoid membranes of *Cryptomonas maculata* (Cryptophyceae). *Eur J Cell Biol* 43, 82-92.
- Riley JP & TRS Wilson (1967): The pigments of some marine phytoplankton species. *J Mar Biol Assoc UK* 47, 351-362.
- Samuelsson G, BM Sweeney, HA Matlick & BB Prezelin (1983): Changes in photosystem II account for the circadian rhythm in photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Plant Physiol* 73, 329-331.
- Samuelsson G & BB Prezelin (1985): Photosynthetic electron transport in cell-free extracts of diverse phytoplankton. *J Phycol* 21, 453-457.
- Satoh K (1988): Reality of P680 chlorophyll protein-identification of the site of primary photochemistry in oxygenic photosynthesis. *Physiol Plant* 72, 209-212.
- Satoh K & DC Fork (1983): A new mechanism for adaptation to changes in light intensity and quality in the red alga, *Porphyra perforata*. I. Relation to State 1-State 2 transitions. *Biochim Biophys Acta* 722, 190-196.
- Scheffczyk B (1986): Untersuchungen zur PS II_{α/β}-Heterogenität bei Spinat und im Verlauf des Zellzyklus der einzelligen Grünalge *Chlorella fusca*. Diplomarbeit, Universität Bremen.
- Schroeder-Lorenz, A & L Rensing (1986): Circadian clock mechanism and synthesis rates of individual protein species in *Gonyaulax polyedra*. *Comp Biochem Physiol* 85B, 315-323.
- Siefermann-Harms D (1980): The role of carotenoids in chloroplasts of higher plants. In: *Biogenesis and Function of Plant Lipids* (P Mazliak, P Benveniste, C Costes & R Douce, eds) pp 331-340, Elsevier Biomedical Press, North-Holland.
- Siefermann-Harms D (1985): Carotenoids in photosynthesis. I. Location in photosynthetic membranes and light-harvesting function. *Biochim Biophys Acta* 811, 325-355.

- Siefermann-Harms D & H Ninnemann (1979): The separation of photochemically active PS-I and PS-II containing chlorophyll-protein complexes by isoelectric focusing of bean thylakoids on polyacrylamide gel plates. *FEBS Lett* 104, 71-77.
- Siegelman HW, JH Kycia & FT Haxo (1977): Peridinin-chlorophyll *a*-proteins of dinoflagellate algae. *Brookhaven Symp Biol* 28, 162-169.
- Snyder UK & J Biggins (1987): Excitation-energy redistribution in the cryptomonad alga *Cryptomonas ovata*. *Biochim Biophys Acta* 892, 48-55.
- Song P-S (1978): Molecular topology of solar energy harvesting pigments in marine algae. *TIBS* 3, 25-27.
- Song P-S, P Koka, BB Prezelin & FT Haxo (1976): Molecular topology of the photosynthetic light-harvesting complex, peridinin-chlorophyll *a*-protein, from marine dinoflagellates. *Biochemistry* 15, 4422-4427.
- Staehelin LA (1986): Chloroplast structure and supramolecular organization of photosynthetic membranes. In: *Encyclopedia of Plant Physiology*, Vol 19 (New Series) Photosynthesis III (LA Staehelin & CJ Arntzen, eds) pp 1-84, Springer, Berlin.
- Strain HH, WM Manning & G Hardin (1944): Xanthophylls and carotenes of diatoms, brown algae, dinoflagellates and sea anemones. *Biol Bull* 86, 169-191.
- Straub O (1987): Key to carotenoids. 2nd ed, H Pfander in collab with M Gerspacher, M Rychener & R Schwabe (eds), Birkhäuser, Basel.
- Svec WA (1978): The isolation, preparation, characterization, and estimation of the chlorophylls and bacteriochlorophylls. In: *The Porphyrins*, Vol V (D Dolphin, ed) pp 341-399, Academic Press, New York.
- Sweeney BM (1981): Freeze-fractured chloroplast membranes of *Gonyaulax polyedra*. *J Phycol* 17, 95-101.
- Sweeney BM (1984): Circadian rhythmicity in dinoflagellates. In: *Dinoflagellates* (DL Spector, ed) pp 343-364, Academic Press, Orlando.
- Sweeney BM (1987): Bioluminescence and circadian rhythms. In: *The Biology of dinoflagellates* (FJR Taylor, ed) pp 269-281, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Sweeney BM & JW Hastings (1957): Characteristics of the diurnal rhythm of luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J Cell Comp Physiol* 49, 115-28.
- Sweeney BM & JW Hastings (1958): Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *J Protozool* 5, 217-224.
- Sweeney BM, FT Haxo & JW Hastings (1959): Action spectra for two effects of light on luminescence in *Gonyaulax polyedra*. *J Gen Physiol* 43, 285-299.
- Sweeney BM & BB Prezelin (1978): Circadian rhythms. *Photochem Photobiol* 27, 841-847.
- Sweeney BM, BB Prezelin, D Wong & Govindjee (1979): *In vivo* chlorophyll *a* fluorescence transients and the circadian rhythm of photosynthesis in *Gonyaulax polyedra*. *Photochem Photobiol* 30, 309-311.
- Thorner JP, GF Peter & R Nechushtal (1987): Biochemical composition and structure of photosynthetic pigment-proteins from higher plants. *Physiol Plant* 71, 236-240.

- Vernon LP (1960): Spectrophotometric determination of chlorophylls and phaeophytins in plant extracts. *Anal Chem* 32, 1144-1150.
- Vicker MG, J Becker, G Gebauer, W Schill & L Rensing (1988): Circadian rhythms of cell cycle processes in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Chronobiology International* 5, 5-17.
- Volknandt W & R. Hardeland (1984): Circadian rhythmicity of protein synthesis in the dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*: a biochemical and radioautographic investigation. *Comp Biochem Physiol* 77B, 493-500.
- Watanabe MM, Y Takeda, T Sasa, I Inouye, S Suda, T Sawaguchi & M Chihara (1987): A green dinoflagellate with the chlorophylls a and b: morphology, fine structure of the chloroplast and chlorophyll composition. *J Phycol* 23, 382-389.
- Watanabe T, M Kobayashi, M Nakazato, I Ikegami & T Hiyama (1987): Chlorophyll a' in photosynthetic apparatus: reinvestigation. In: *Progress in Photosynthesis Research*, Vol 1 (J Biggins, ed) pp 303-306, Nijhoff, Dordrecht.
- Winter J & P Brandt (1986): Stage-specific State I-State II transitions during the cell cycle of *Euglena gracilis*. *Plant Physiol* 81, 548-552.
- Witt HT (1971): Coupling of quanta, electrons, fields, ions, and phosphorylation in the functional membrane of photosynthesis: results by pulse spectroscopic methods. *Quart Rev Biophys* 4, 365-477.
- Wollman FA & P Bennoun (1982): A new chlorophyll-protein complex related to photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 680, 352-360.
- Wray W, T Bouliskas, VP Wray & R Hancock (1981): Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 118, 197-203.
- Wright SW & JD Shearer (1984): Rapid extraction and high-performance liquid chromatography of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *J Chrom* 294, 281-295.

Danke

Prof. Dr. L. Rensing für die Überlassung des Themas, seine vielfältigen Hilfestellungen und stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. L.H. Grimme für die Erlaubnis zur Nutzung des Photosyntheselabors.

Dr. Ingo Damm für die wertvolle Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten. So sind lange (Bl)Eichnächte an der schnarrenden HPLC-Anlage in lebhafter Erinnerung. Ferner für die unermüdlichen Diskussionen während der Fertigstellung der Arbeit. Die oft niederschmetternde Kritik erwies sich letztendlich immer als konstruktiv.

Berthold Scheffczyk für seine Geduld bei der Erläuterung der quantitativen Auswertung der Fluoreszenzinduktionskurven, Gerd Gebauer für die Umsetzung dieses Auswertungsmodus in ein Computerprogramm.

Rolf Altenburger, Martin Hebeler, Dieter Steinmetz und Dr. Dieter Techel für das kritische Lesen des Manuskripts.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe der 'Rensing', und einer gewissen benachbarten Gruppe für das hervorragende Arbeitsklima und dem Schaffen von Rahmenbedingungen, mit denen Finanzlücken im Etat überbrückt werden konnten.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für ihre großzügige Unterstützung danken.

